



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

REC'D 16 FEB 2004

WIPO PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

03090275.3

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

R C van Dijk



Anmeldung Nr:  
Application no.: 03090275.3  
Demande no:

Anmeldetag:  
Date of filing: 29.08.03  
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Bayer CropScience GmbH  
Brüningstrasse 50  
65929 Frankfurt/Main  
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:  
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.  
If no title is shown please refer to the description.  
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine Stärke mit erhöhter Endviskosität  
synthetisieren

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)  
revendiquée(s)  
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/  
Classification internationale des brevets:

A01H/

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten/Contracting states designated at date of  
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL  
PT RO SE SI SK TR LI

5

EPOLITUA  
29-08-2003

BCS-03-5003-EP

10

## **Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine Stärke mit erhöhter Endviskosität synthetisieren**

### ***Beschreibung***

15

Die vorliegende Erfindung betrifft Pflanzenzellen und Pflanzen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität von SSIII- und BEI- und BEII-Proteinen im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen führt. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung

20

Mittel und Verfahren zur Herstellung solcher Pflanzenzellen und Pflanzen. Derartige Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen Amylosegehalt von mindestens 30% und einen im Vergleich zu Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen einen erhöhten Phosphatgehalt und eine gegenüber dem Stand der Technik erhöhte

25

Endviskosität in der RVA Analyse und/oder eine veränderte Seitenkettenverteilung und/oder eine erhöhte Gelfestigkeit im Texture Analyser und/oder eine veränderte Stärkekornmorphologie und/oder eine veränderte mittlere Stärkekorngröße aufweist.

30

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke sowie Verfahren zur Herstellung dieser Stärke.

35

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen zur Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

- Das Polysaccharid Stärke ist ein Polymer aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glukosemolekülen. Es handelt sich dabei jedoch um ein sehr komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen, die sich hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades und des Auftretens von Verzweigungen der Glukoseketten unterscheiden. Daher stellt
- 5 Stärke keinen einheitlichen Rohstoff dar. Man unterscheidet zwei chemisch unterschiedliche Komponenten der Stärke: die Amylose und das Amylopektin. In typischen für die Stärkeproduktion verwendeten Pflanzen, wie z.B. Mais, Weizen oder Kartoffel, besteht die synthetisierte Stärke zu ca. 20% - 30% aus Amylose-Stärke und zu ca. 70% - 80% aus Amylopektin-Stärke.
- 10 Amylose wurde lange als lineares Polymer, bestehend aus  $\alpha$ -1,4-glycosidisch verknüpften  $\alpha$ -D-Glukose-Monomeren, angesehen. In neueren Studien wurde jedoch die Anwesenheit von  $\alpha$ -1,6-glycosidischen Verzweigungspunkten (ca. 0,1%) nachgewiesen (Hizukuri und Takagi, Carbohydr. Res. 134, (1984), 1-10; Takeda et al., Carbohydr. Res. 132, (1984), 83-92).
- 15 Es stehen unterschiedliche Methoden zur Bestimmung des Amylosegehaltes zur Verfügung. Einige dieser Methoden basieren auf dem Iodbindevermögen der Amylose, das potentiometrisch (Banks & Greenwood, in W. Banks & C.T. Greenwood, Starch and its components (pp. 51-66), Edinburgh, Edinburgh University Press), amperometrisch
- 20 (Larson et al., Analytical Chemistry 25(5), (1953), 802-804) oder spektrophotometrisch (Morrison & Laignelet, J. Cereal Sc. 1, (1983), 9-20) bestimmt werden kann. Die Bestimmung des Amylosegehaltes kann auch kalorimetrisch mittels DSC-(Differential Scanning Calorimetry)-Messungen erfolgen (Kugimiya & Donovan, Journal of Food Science 46, (1981), 765-770; Sievert & Holm, Starch/Stärke 45 (4), (1993), 136-139).
- 25 Ferner besteht die Möglichkeit, den Amylosegehalt über den Einsatz von SEC-(size exclusion chromatography)-Chromatographie von nativer oder entzweigter Stärke zu bestimmen. Diese Methode wurde insbesondere zur Bestimmung des Amylosegehaltes gentechnisch modifizierter Stärken empfohlen (Gérard et al., Carbohydrate Polymers 44, (2001), 19-27).
- 30 Im Gegensatz zur Amylose ist das Amylopektin stärker verzweigt und weist ca. 4% Verzweigungspunkte auf, die durch das Auftreten von zusätzlichen  $\alpha$ -1,6-glycosidischen Verknüpfungen zustande kommen. Das Amylopektin stellt ein komplexes Gemisch aus unterschiedlich verzweigten Glukoseketten dar.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Amylose und Amylopektin liegt im Molekulargewicht. Während Amylose, je nach Herkunft der Stärke, ein Molekulargewicht von  $5 \times 10^5 - 10^6$  Da besitzt, liegt das des Amylopektins zwischen  $10^7$  und  $10^8$  Da. Die beiden Makromoleküle können durch ihr Molekulargewicht und ihre unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften differenziert werden, was am einfachsten durch ihre unterschiedlichen Jodbindungseigenschaften sichtbar gemacht werden kann.

Die funktionellen Eigenschaften der Stärke werden neben dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis und dem Phosphatgehalt stark beeinflusst durch das Molekulargewicht, das Muster der Seitenkettenverteilung, den Gehalt an Ionen, den Lipid- und Proteingehalt, die mittlere Stärkekorngröße sowie die Stärkekornmorphologie etc. Als wichtige funktionelle Eigenschaften sind hierbei beispielsweise zu nennen die Löslichkeit, das Retrogradationsverhalten, das Wasserbindevermögen, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die Verkleisterungseigenschaften, die Gefrier-Tau-Stabilität, die Säurestabilität, die Gelfestigkeit etc.. Auch die Stärkekorngröße kann für verschiedene Anwendungen von Bedeutung sein.

Die Verkleisterungseigenschaften, denen auch die Endviskosität zuzurechnen ist, werden häufig vom Fachmann mit unterschiedlichen Methoden bestimmt. Je nach verwendeter Methode können sich insbesondere absolute, aber auch relative Werte für ein und dieselbe Stärkeprobe unterscheiden. Eine schnelle und effiziente Methode zur Analyse der Verkleisterungseigenschaften bietet die RVA Analyse. Je nach Wahl der Parameter und des Temperaturprofils bei der RVA Analyse erhält man unterschiedliche RVA-Profile für ein und dieselbe Probe. Es sei darauf hingewiesen, dass im folgend aufgeführten Stand der Technik teilweise unterschiedliche Profile zur Bestimmung der Verkleisterungseigenschaften verwendet wurden.

Eine Übersicht zu verschiedenen Pflanzenspezies, die eine Reduktion von an der Stärkebiosynthese beteiligten Enzymen aufweisen, findet sich bei Kossmann und Lloyd (2000, Critical Reviews in Plant Sciences 19(3), 171-126).

Bisher sind Pflanzen beschrieben, bei welchen die Aktivität eines SSIII Proteins (Abel et al., 1996, The Plant Journal 10(6), 9891-991; Lloyd et al., 1999, Biochemical Journal 338, 515-521) bzw. die Aktivität eines BEI Proteins (Kossmann et al. 1991, Mol Gen

Genet 230, 39-44); Safford et al., 1998, Carbohydrate Polymers 35, 155-168, bzw. die Aktivität eines BEII Proteins (Jobling et al., 1999, The Plant Journal 18, bzw. die Aktivität eines BEI und BEII Proteins (Schwall et al., 2000, Nature Biotechnology 18, 551- 554; WO 96/34968), bzw. die Aktivität eines BEI und eines SSIII (WO 00/08184)

5 Proteins reduziert sind .

Pflanzen, bei welchen die Aktivität eines SSIII Proteins reduziert ist, zeigen, verglichen mit entsprechenden Wildtyp-Pflanzen, eine relative Verschiebung der Seitenketten des Amylopektins von längeren Ketten zu kurzen Ketten (Lloyd et al., 1999, Biochemical Journal 338, 515-521), einen um 70% erhöhten Phosphatgehalt, keine Veränderung  
 10 des Amylosegehaltes (Abel et al., 1996, The Plant Journal 10(6), 9891-991) und eine erniedrigte Endviskosität in der RVA Analyse (Abel, 1995, Dissertation der Freien Universität Berlin). Solche Pflanzen, die auch in WO 00/08184 beschrieben sind, weisen in der isolierten Stärke gegenüber nicht transformierten Wildtyp-Pflanzen einen um 197% gesteigerten Phosphatgehalt, einen um 123% gesteigerten Amylosegehalt  
 15 und eine Endviskosität in der RVA Analyse, die auf 76% des Wildtyps sinkt, auf. Außerdem sinkt die Gelfestigkeit der betreffenden Stärke auf 84% des Wildtyps.

Pflanzen, die eine verringerte Aktivität sowohl eines BEI -, als auch eines BE II Proteins aufweisen, zeigen in der spektrophotometrischen Analyse nach Morrison & Laignelet  
 20 (1983, J. Cereal Sc. 1, 9-20) einen Amylosegehalt von maximal 89,14% (entspricht 344% des Wildtyps) und einen Phosphatgehalt der Stärke, der maximal 522% desjenigen von Stärke, isoliert aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzen, entspricht. Diese Stärken zeigten in der RVA Analyse einen um maximal 237% gesteigerten Wert der Endviskosität. Des Weiteren zeigen Stärkekörner, die aus solchen Pflanzen isoliert  
 25 wurden, eine veränderte Stärkekormorphologie, die sich dadurch auszeichnet, dass die Stärkekörner in der Mikroskopie unter polarisiertem Licht große Furchen im Zentrum des jeweiligen Kornes aufwiesen.

Daraus ergibt sich, dass dem Fachmann Pflanzenzellen und Pflanzen und von diesen  
 30 synthetisierte Stärken bekannt sind, welche einen erhöhten Amylose- und Phosphatgehalt aufweisen, deren Endviskosität in der RVA Analyse jedoch nicht mehr als maximal 256% gegenüber nicht genetisch modifizierten Wildtyp Pflanzen erhöht ist. Höhere Endviskositäten in der RVA Analyse konnten bisher nicht erreicht werden. Dieses wäre jedoch wünschenswert, weil z.B. bei Verwendung einer solchen Stärke als

Dickungs-, Gelier- oder Bindemittel weniger Feststoff an Stärke eingesetzt werden muß, um den gewünschten Effekt zu erzielen. Dadurch kann z.B. die Menge an Zusatzstoffen in menschlichen und tierischen Nahrungsmitteln, in die Gesundheit erhaltenden Produkten (Healthcare products) und Kosmetika reduziert werden. Auch bei der Verwendung einer solchen Stärke in Klebstoffen können geringere Mengen Stärke eingesetzt werden, was zu einer Reduzierung der Kosten z.B. bei der Herstellung von z.B. Papier, Pappe oder Dämmplatten führt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Pflanzenzellen, Pflanzen und Stärke aus entsprechenden Pflanzenzellen bzw. Pflanzen zur Verfügung zu stellen, die einen erhöhten Amylosegehalt sowie einen erhöhten Phosphatgehalt und in der RVA Analyse eine um mindestens 270% erhöhte Endviskosität und/oder eine erhöhte Gelfestigkeit der gelatinisierten Stärke und/oder eine veränderte Stärkekornmorphologie aufweisen.

- 15 Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung eine Pflanzenzelle, die genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden SSIII-Proteine und zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEI-Proteine und zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEII-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

Die genetische Modifikation kann dabei jede genetische Modifikation sein, die zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden SSIII-Proteine und zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEI-Proteine und zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEII-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

- Im Zusammenhang mit der Erfindung kann die genetische Modifikation beispielsweise die Herstellung von erfindungsgemäßen Pflanzenzellen durch Mutagenese eines oder mehrerer Gene umfassen. Die Art der Mutation ist dafür unerheblich, solange sie zu einer Reduktion der Aktivität eines SSIII-Proteins und/oder eines BEI-Proteins und/oder eines BEII-Proteins führt. Unter dem Begriff „Mutagenese“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jegliche Art von Mutation verstanden werden, wie z.B. Deletionen, Punktmutationen (Nukleotidaustausche), Insertionen, Inversionen, Genkonversionen oder Chromosomentranslokation.
- Die Mutation kann dabei durch den Einsatz chemischer Agentien oder energiereicher Strahlung (z.B. Röntgen-, Neutronen-, Gamma- UV-Strahlung) erzeugt werden. Agentien, die zur Erzeugung chemisch induzierter Mutationen eingesetzt werden können und die durch Einwirkung der entsprechenden Mutagene dabei entstehenden Mutationen sind z.B. beschrieben bei Ehrenberg und Husain, 1981, (Mutation Research 86, 1-113) und Müller, 1972 (Biologisches Zentralblatt 91 (1), 31-48). Die Erzeugung von Reismutanten unter Verwendung von gamma Strahlen, Ethyl-Methan-Sulfonat (EMS), N-methyl-N-Nitrosurea oder Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) ist z.B. beschrieben in Jauhar und Siddiq (1999, Indian Journal of Genetics, 59 (1), 23-28), bei Rao (1977, Cytologica 42, 443-450), Gupta und Sharma (1990, Oryza 27, 217-219) und Satoh und Omura (1981, Japanese Journal of Breeding 31 (3), 316-326). Die Erzeugung von Weizenmutanten unter Verwendung von  $\text{NaN}_3$  bzw. Maleic hydrazide ist in Arora et al. (1992, Anals of Biology 8 (1), 65-69) beschrieben. Eine Übersicht zur Erzeugung von Weizenmutanten unter Verwendung von verschiedenen Arten energiereicher Strahlung und chemischer Agenzien ist in Scarascia-Mugnozza et al. (1993, Mutation Breeding Review 10, 1-28) dargestellt. Svec et al. (1998, Cereal Research Communications 26 (4), 391-396) beschreibt die Anwendung von N-ethyl-N-Nitrosurea zur Erzeugung von Mutanten in Triticale. Die Verwendung von MMS und gamma-Strahlung zur Erzeugung von Hirsemutanten ist in Shashidhara et al. (1990, Journal of Maharashtra Agricultural Universities 15 (1), 20-23) beschrieben.
- Die Herstellung von Mutanten in Pflanzenspezies, die sich hauptsächlich vegetativ vermehren, wurde z.B. für Kartoffeln, die eine veränderte Stärke produzieren (Hovenkamp-Hermelink et al. (1987, Theoretical and Applied Genetics 75, 217-221) und für Minze mit erhöhtem Ölertrag bzw. veränderter Ölqualität (Dwivedi et al., 2000, Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 22, 460-463) beschrieben. Alle diese



Methoden sind grundsätzlich geeignet, die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die von ihnen produzierte Stäke herzustellen.

Das Auffinden von Mutationen in den entsprechenden Genen, insbesondere in Genen codierend ein BEI Protein und/oder ein BEII Protein und/oder ein SSIII Protein, kann mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Methoden geschehen. Insbesondere können hierzu Analysen, basierend auf Hybridisierungen mit Sonden (Southern Blot), der Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR), der Sequenzierung betreffender genomischer Sequenzen und die Suche nach einzelnen Nukleotidaustauschen angewandt werden. Eine Methode, um Mutationen anhand von Hybridisierungsmustern zu identifizieren, ist z.B. die Suche nach Restriktionsfragment Längen-Unterschieden (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) (Nam et al., 1989, The Plant Cell 1, 699-705; Leister and Dean, 1993, The Plant Journal 4 (4), 745-750). Eine auf PCR basierende Methode ist z.B. die Analyse von amplifizierten Fragment Längenunterschieden (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) (Castiglioni et al., 1998, Genetics 149, 2039-2056; Meksem et al., 2001, Molecular Genetics and Genomics 265, 207-214; Meyer et al., 1998, Molecular and General Genetics 259, 150-160). Auch die Verwendung von mit Restriktionsendonukleasen geschnittenen amplifizierten Fragmenten (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, CAPS) kann zur Identifizierung von Mutationen herangezogen werden (Konieczny und Ausubel, 1993, The Plant Journal 4, 403-410; Jarvis et al., 1994, Plant Molecular Biology 24, 685-687; Bachem et al., 1996, The Plant Journal 9 (5), 745-753). Methoden zur Ermittlung von SNPs sind u.a. von Qi et al. (2001, Nucleic Acids Research 29 (22), e116) Drenkard et al. (2000, Plant Physiology 124, 1483-1492) und Cho et al. (1999, Nature Genetics 23, 203-207) beschrieben worden. Insbesondere sind Methoden, die es erlauben, viele Pflanzen innerhalb kurzer Zeit auf Mutationen in bestimmten Genen hin zu untersuchen, geeignet. Solch eine Methode, das sogenannte TILLING (Targetting Induced Local Lesions IN Genomes), ist von McCallum et al. (2000, Plant Physiology 123, 439-442) beschrieben worden.

30

Die Verwendung aller dieser Methoden ist grundsätzlich im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet.

Hoogkamp et al. (2000, Potato Research 43, 179-189) haben stabile Mutanten in Kartoffel isoliert, die eine amylosefreie Stärke enthalten. Diese Pflanzen synthetisieren kein aktives Enzym mehr für eine stärkekorngelundene Stärkesynthase (GBSS I). Nach erneuter Mutagenese dieser Pflanzen könnten solche selektiert werden, die  
5 zusätzliche Mutationen in Genen, die an der Stärkesynthase beteiligt sind, aufweisen. Dadurch könnten Pflanzen erzeugt werden, die Stärke mit verbesserten Eigenschaften synthetisieren. Nach der entsprechenden Methode können auch die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, die eine erfindungsgemäße Stärke produzieren, identifiziert und isoliert werden.

10 Weiterhin können die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen auch mit Hilfe von homologen, d.h. natürlicherweise in den entsprechenden Pflanzenzellen enthaltenen, Transposons erzeugt werden. Eine detaillierte Darstellung dieser Methode erfolgt weiter unten.

15 Alle zuvor genannten Methoden sind grundsätzlich dazu geeignet, erfindungsgemäße Pflanzenzellen und die von ihnen synthetisierte modifizierte Stärke herzustellen. Daher sind Verfahren zur Herstellung genetisch modifizierter Pflanzenzellen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, wobei diese Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass  
20 sie einen Amylosegehalt von mindestens 30% enthält, im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen einen erhöhten Phosphatgehalt aufweist und in der RVA Analyse im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine erhöhte Endviskosität aufweist, auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

25 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung einer Pflanzenzelle, die eine modifizierte Stärke synthetisiert, umfassend die genetische Modifikation der Pflanzenzelle, wobei die genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden SSIII-Proteine und zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der  
30 Pflanzenzelle vorkommenden BEI-Proteine und zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEII-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

Noch ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung einer genetisch modifizierten Pflanze, die eine modifizierte Stärke synthetisiert, wobei

- a) eine Pflanzenzelle wie vorstehend beschrieben hergestellt wird;
- b) aus oder mit der gemäß a) hergestellten Pflanzenzelle eine Pflanze regeneriert wird; und
- c) gegebenenfalls aus der gemäß Schritt b) erzeugten Pflanze weitere Pflanzen erzeugt werden.

Der Begriff "genetisch modifiziert" bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass die Pflanzenzelle in ihrer genetischen Information verändert ist.

Dabei weisen die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen eine Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden SSIII-Proteine und eine Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEI-Proteine und eine Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEII-Proteine auf im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

Die genetischen Modifikationen zur Erzeugung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen können gleichzeitig oder in aufeinanderfolgenden Schritten erfolgen. Dabei kann jede genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer SSIII-Proteine und/oder eines oder mehrerer BEI-Proteine und/oder eines oder mehrerer BEII-Proteine führen. Es kann sowohl von Wildtyp-Pflanzen bzw. -Pflanzenzellen ausgegangen werden, in denen noch keine vorherige genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer SSIII-Proteine und/oder eines oder mehrerer BEI-Proteine und/oder eines oder mehrerer BEII-Proteine erfolgt ist, oder von bereits genetisch modifizierten Pflanzenzellen bzw. Pflanzen, in denen bereits durch eine genetische Modifikation die Aktivität eines oder mehrerer SSIII-Proteine und/oder eines oder mehrerer BEI-Proteine und/oder eines oder mehrerer BEII-Proteine erfolgt ist. Soweit bereits von solchen genetisch modifizierten Pflanzen(zellen) ausgegangen wird, betreffen die weiter durchgeführten genetischen Modifikationen vorzugsweise nur die Aktivität jeweils eines oder mehrerer der noch nicht in ihrer Aktivität verringerten Proteine (SSIII, BEI bzw. BEII).

Beispielsweise zeigen genetisch modifizierte erfindungsgemäße Pflanzenzellen eine Verringerung der Expression eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden SSIII-Gene und eine Verringerung der Expression eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEI-Gene und eine Verringerung der Expression eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEII-Gene und/oder eine Verringerung der Aktivität jeweils eines oder mehrerer der vorgenannten in der Pflanzenzelle vorkommenden Proteine im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

10 Der Begriff "Verringerung der Aktivität" bedeutet dabei im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Verringerung der Expression endogener Gene, die SSIII-, BEI- und/oder BEII-Proteine codieren, und/oder eine Verringerung der Menge an SSIII-, BEI- und/oder BEII-Protein in den Zellen und/oder eine Verringerung der enzymatischen Aktivität der SSIII-, BEI- und/oder BEII-Proteine in den Zellen.

15 Die Verringerung der Expression kann beispielsweise bestimmt werden durch Messung der Menge an SSIII-, BEI- oder BEII-Proteinen codierenden Transkripten, z.B. durch Northern-Blot-Analyse oder RT-PCR. Eine Verringerung bedeutet dabei vorzugsweise eine Verringerung der Menge an Transkripten im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 95%.

20 Die Verringerung der Menge an SSIII-, BEI- und/oder BEII-Proteinen, die eine verringerte Aktivität dieser Proteine in den betreffenden Pflanzenzellen zur Folge hat, kann beispielsweise bestimmt werden durch immunologische Methoden wie Western-Blot-Analyse, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) oder RIA (Radio Immune Assay). Eine Verringerung bedeutet dabei vorzugsweise eine Verringerung der Menge an SSIII-, BEI- und/oder BEII-Protein im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 95%.

30 Unter SSIII-Protein ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Klasse von löslichen Stärkesynthasen (ADP-Glukose 1,4-alpha-D-glucan 4-alpha-D-glucosyltransferase; EC 2.4.1.21) zu verstehen. Lösliche Stärkesynthasen katalysieren eine Glycosylierungsreaktion, bei der Glukosereste des Substrates ADP-Glukose unter

Bildung einer alpha 1,4-Verknüpfung auf alpha-1,4-verknüpfte Glukanketten übertragen werden. (ADP-Glukose + {(1,4)-alpha-D-glucosyl}(N)  $\rightleftharpoons$  ADP + {(1,4)-alpha-D-glucosyl}(N+1)).

- 5 Beschrieben sind SSIII Proteine zum Beispiel bei Marshall et al. (The Plant Cell 8; (1996); 1121-1135), Li et al. (2000, Plant Physiology 123, 613-624), Abel et al. (The Plant Journal 10(6); (1996); 981-991) und in WO 0066745. SSIII Proteine weisen häufig in ihrem Aufbau eine Abfolge von Domänen auf. SSIII Proteine haben am N-Terminus ein Signalpeptid für den Transport in Plastiden. In Richtung C-Terminus folgen eine N-
- 10 terminale Region, eine SSIII spezifische Region und eine katalytische Domäne (Li et al., 2000, Plant Physiology 123, 613-624). Weitere Analysen, basierend auf Primärsequenzvergleichen (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>), ergaben, dass das SSIII Protein aus Kartoffel eine sogenannte Kohlenhydrat Bindedomäne (CBM von Carbohydrate Binding Domain) aufweist. Diese Domäne (Pfam Motiv cbm 25) umfasst
- 15 die Aminosäuren 377 bis 437 der in Seq ID Nr. 2 dargestellten Sequenz des SSIII-Proteins aus Kartoffel. Unter einem SSIII Protein sollen daher im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Stärkesynthasen verstanden werden, die zu der in Seq ID Nr. 3 dargestellten Sequenz eine Identität von mindestens 50% aufweisen, bevorzugt von mindestens 60%, besonders bevorzugt von mindestens 70%, weiter bevorzugt von
- 20 mindestens 80%, und insbesondere von mindestens 90%.

Unter dem Begriff Homologie bzw. Identität soll die Anzahl der übereinstimmenden Aminosäuren (Identität) mit anderen Proteinen, ausgedrückt in Prozent verstanden werden. Bevorzugt wird die Identität durch Vergleiche der Seq. ID Nr. 3 zu anderen

25 Proteinen mit Hilfe von Computerprogrammen ermittelt. Weisen Sequenzen, die miteinander verglichen werden, unterschiedliche Längen auf, ist die Identität so zu ermitteln, dass die Anzahl an Aminosäuren, welche die kürzere Sequenz mit der längeren Sequenz gemeinsam hat, den prozentualen Anteil der Identität bestimmt. Die Identität kann standardmäßig mittels bekannten und der Öffentlichkeit zur Verfügung

30 stehenden Computerprogrammen wie z.B. ClustalW (Thompson et al., Nucleic Acids Research 22 (1994), 4673-4680) ermittelt werden. ClustalW wird öffentlich zur Verfügung gestellt von Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) und Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE), European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Germany. ClustalW kann ebenfalls von

verschiedenen Internetseiten, u.a. beim IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, France; <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/>) und beim EBI (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>) sowie bei allen gespiegelten Internetseiten des EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK), heruntergeladen werden.

5 Wenn das ClustalW Computerprogramm der Version 1.8 benutzt wird, um die Identität zwischen z.B. dem Referenzprotein der vorliegenden Anmeldung und anderen Proteinen zu bestimmen, sind folgende Parameter einzustellen: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAPOPEN=10, GAPEXTEND=0.05, 10 GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP.

Eine Möglichkeit zum Auffinden von ähnlichen Sequenzen, ist die Durchführung von Sequenzdatenbankrecherchen. Hierbei wird eine oder werden mehrere Sequenzen als sogenannte Abfrage (= query) vorgegeben. Diese Abfragesequenz wird dann mittels statistischen Computerprogrammen mit Sequenzen, die in den ausgewählten 15 Datenbanken enthalten sind, verglichen. Solche Datenbankabfragen (blast searches) sind dem Fachmann bekannt und können bei verschiedenen Anbietern durchgeführt werden. Wird eine solche Datenbankabfrage z.B. beim NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt, so sollen die Standardeinstellungen, die für die jeweilige Vergleichsanfrage vorgegeben sind, benutzt 20 werden. Für Proteinsequenzvergleiche (blastp) sind dieses folgende Einstellungen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect value = 10; word size = 3; Matrix = BLOSUM62; Gap costs: Existence = 11, Extension = 1. Als Ergebnis einer solchen Abfrage werden neben anderen Parametern auch der Anteil an Identität zwischen der Abfragesequenz und den in den Datenbanken aufgefundenen ähnlichen 25 Sequenzen dargestellt.

Unter einem SSIII Protein sollen daher im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Stärkesynthasen verstanden werden, die bei der Verwendung mindestens einer der vorstehend beschriebenen Methoden zur Identitätsbestimmung zu der in Seq ID Nr. 3 dargestellten Sequenz eine Identität von mindestens 50% aufweisen, 30 bevorzugt von mindestens 60%, besonders bevorzugt von mindestens 70%, weiter bevorzugt von mindestens 80%, und insbesondere von mindestens 90%.

Unter dem Begriff SSIII-Gen soll im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Nukleinsäuremolekül (DNA, cDNA, RNS) verstanden werden, welches ein SSIII-Protein,

vorzugsweise aus Kartoffel, codiert. Nukleinsäuremoleküle codierend für ein SSIII-Protein sind für verschiedene Pflanzenspezies wie z.B. Kartoffel (Abel et al., The Plant Journal 10(6); (1996); 981-991), Weizen (WO 00/66745, Li et al., 2000, Plant Physiology 123, 613-624; Genbank Acc. No AF258608; Genbank Acc. No AF258609),  
 5 Mais (Gao et al., 1998, Plant Cell 10 (3), 399-412; Genbank Acc. No AF023159), *Vigna* (Genbank Acc. No AJ225088), Reis (Genbank Acc. No AY100469; Genbank Acc. No AF43291) und *Arabidopsis* (Genbank Acc. No AC007296) beschrieben.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff „Branching Enzyme“  
 10 oder „BE-Protein“ ( $\alpha$ -1,4-Glucan: $\alpha$ -1,4-Glucan 6-Glycosyltransferase, E.C. 2.4.1.18) ein Protein verstanden, das eine Transglycosylierungsreaktion katalysiert, in der  $\alpha$ -1,4-Verknüpfungen eines  $\alpha$ -1,4-Glucandonors hydrolysiert und die dabei freigesetzten  $\alpha$ -1,4-Glucanketten auf eine  $\alpha$ -1,4-Glucanakzeptorkette transferiert und dabei in  $\alpha$ -1,6-Verknüpfungen überführt werden.

15 Unter dem Begriff "BEI-Protein" soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Verzweigungsenzym (branching enzyme = BE) der Isoform I verstanden werden. Vorzugsweise stammt das BEI-Protein aus Kartoffelpflanzen.

Die Bezeichnung der Isoformen lehnt dabei an der von Smith-White und Preiss  
 20 vorgeschlagenen Nomenklatur an (Smith-White und Preiss, Plant Mol. Biol. Rep. 12; (1994), 67-71, Larsson et al., Plant Mol Biol. 37, (1998), 505-511). Diese Nomenklatur geht davon aus, dass alle Enzyme, die zum BEI-Protein aus Mais (GenBank Acc. No. D11081; Baba et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 181 (1), (1991), 87-94; Kim et al. Gene 216, (1998), 233-243) eine höhere Homologie (Identität) auf Aminosäureebene  
 25 aufweisen als zum BEII-Protein aus Mais (Genbank Acc. No AF072725 , U65948), als Branching Enzyme der Isoform I oder kurz als BEI-Proteine bezeichnet werden.

Unter dem Begriff „BEII-Protein“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Verzweigungsenzym (branching enzyme = BE) der Isoform II verstanden werden.  
 30 Vorzugsweise stammt dieses aus Kartoffelpflanzen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sollen alle Enzyme, die auf Aminosäureebene zum BEII-Protein aus Mais (Genbank Acc. No AF072725, U65948) eine höhere Homologie (Identität)

aufweisen als zum BEI-Protein aus Mais (Genbank Acc. No. D 11081, AF 072724 ), als BEII-Protein bezeichnet werden.

Unter dem Begriff „BEI-Gen“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein  
 5 Nukleinsäuremolekül (cDNA, DNA) verstanden werden, das ein „BEI-Protein“, vorzugsweise ein BEI-Protein aus Kartoffelpflanzen, codiert. Derartige Nukleinsäuremoleküle sind für zahlreiche Pflanzen beschrieben worden, beispielsweise für Mais (Genbank Acc. No. D 11081, AF 072724), Reis (Genbank Acc. No. D11082), Erbse (Genbank Acc. No. X80010) und Kartoffel. Verschiedene Formen des BEI-Gens  
 10 bzw. des BEI-Proteins aus Kartoffel wurden beispielsweise beschrieben bei Khoshnoodi et al., Eur. J. Biochem. 242 (1), 148-155 (1996), Genbank Acc. No. Y 08786 und bei Kossmann et al., Mol. Gen. Genet. 230, (1991), 39-44). In Kartoffelpflanzen wird das BEI-Gen hauptsächlich in den Knollen und kaum in den Blättern exprimiert (Larsson et al., Plant Mol. Biol. 37, (1998), 505-511).

15 Unter dem Begriff „BEII-Gen“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Nukleinsäuremolekül (z.B. cDNA, DNA) verstanden werden, das ein „BEII-Protein“ codiert, vorzugsweise ein BEII-Protein aus Kartoffelpflanzen. Derartige Nukleinsäuremoleküle sind für zahlreiche Pflanzen beschrieben worden, beispielsweise  
 20 für Kartoffel (GenBank Acc. No. AJ000004, AJ011888, AJ011889, AJ011885, AJ011890, EMBL GenBank A58164), Mais (AF 072725, U65948), Gerste (AF064561), Reis (D16201) und Weizen (AF 286319). In Kartoffelpflanzen wird das BEII-Gen hauptsächlich in den Blättern und kaum in den Knollen exprimiert (Larsson et al., Plant Mol. Biol. 37, (1998), 505-511).

25 Der Begriff "transgen" bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen aufgrund der Einführung eines fremden Nukleinsäuremoleküls oder mehrerer fremder Nukleinsäuremoleküle in die Zelle in ihrer genetischen Information von entsprechenden nicht genetisch modifizierten  
 30 Pflanzenzellen abweichen.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besteht die genetische Modifikation der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzelle in der Einführung eines oder mehrerer fremder Nukleinsäuremoleküle, deren Vorhandensein und/oder



Expression zur Verringerung der Aktivität von SSIII- und BEI- und BEII-Proteinen führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen. Im speziellen versteht man unter dem Begriff der genetischen Modifikation das Einbringen von homologen und/oder heterologen und/oder mutagenisierten fremden Nukleinsäuremolekülen in eine Pflanzenzelle, wobei besagtes Einbringen dieser Moleküle zur Reduktion der Aktivität eines SSIII-Proteins und/oder eines BEI-Proteins und/oder BEII Proteins führt.

Unter dem Begriff "fremdes Nukleinsäuremolekül" bzw. „fremder Nukleinsäuremoleküle“ versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein solches Molekül, das entweder natürlicherweise in entsprechenden Pflanzenzellen nicht vorkommt, oder das in der konkreten räumlichen Anordnung nicht natürlicherweise in den Pflanzenzellen vorkommt oder das an einem Ort im Genom der Pflanzenzelle lokalisiert ist, an dem es natürlicherweise nicht vorkommt. Bevorzugt ist das fremde Nukleinsäuremolekül ein rekombinantes Molekül, das aus verschiedenen Elementen besteht, deren Kombination oder spezifische räumliche Anordnung natürlicherweise in pflanzlichen Zellen nicht auftritt.

Bei dem bzw. den zur genetischen Modifikation verwendeten fremden Nukleinsäuremolekül(en) kann es sich um ein zusammengefügtes oder mehrere getrennte Nukleinsäurekonstrukte handeln, insbesondere sogenannte Einfach-, Zweifach- und Dreifachkonstrukte. So kann das fremde Nukleinsäuremolekül beispielsweise ein sogenanntes "Dreifachkonstrukt" sein, worunter man einen einzigen Vektor zur Pflanzentransformation versteht, der sowohl die genetische Information zur Inhibierung der Expression eines oder mehrerer endogener SSIII-Gene als auch zur Inhibierung der Expression eines oder mehrerer BEI- und eines oder mehrerer BEII-Gene enthält oder dessen Vorhandensein bzw. dessen Expression zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer SSIII-, BEI- und BEII-Proteine führt.

In einer weiteren Ausführungsform kann das fremde Nukleinsäuremolekül ein sogenanntes „Doppelkonstrukt“ sein, worunter man einen Vektor zur Pflanzentransformation versteht, der die genetische Information zur Inhibierung der Expression von zwei der drei Zielgene (SSIII-, BEI-, BEII-Gen) enthält oder dessen Vorhandensein bzw. dessen Expression zur Verringerung der Aktivität von zwei der drei Zielproteine (SSIII-, BEI-, BEII-Proteine) führt. Die Inhibierung der Expression des

dritten Zielgens und/oder die Verringerung der Aktivität des dritten Zielproteins erfolgt in dieser Ausführungsform der Erfindung mit Hilfe eines gesonderten fremden Nukleinsäuremoleküls, das die entsprechende genetische Information zur Inhibierung dieses dritten Zielgens enthält.

5

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird in das Genom der Pflanzenzelle nicht ein Dreifachkonstrukt, sondern es werden mehrere unterschiedliche fremde Nukleinsäuremoleküle eingeführt, wobei eines dieser fremden Nukleinsäuremoleküle beispielsweise ein DNA-Molekül ist, das z.B. ein Cosuppressions-Konstrukt darstellt,

10 das eine Verringerung der Expression von einem oder mehreren endogenen SSIII-Genen bewirkt, und ein weiteres fremdes Nukleinsäuremolekül ein DNA-Molekül ist, das z.B. eine antisense-RNA codiert, die eine Verringerung der Expression von einem oder mehreren endogenen BEI- und/oder BEII-Genen bewirkt. Grundsätzlich ist bei der Konstruktion der fremden Nukleinsäuremoleküle aber auch die Verwendung jeder  
15 Kombination aus antisense-, cosuppressions-, Ribozym- und doppelsträngigen RNA Konstrukten oder in-vivo-Mutagenese geeignet, die zu einer gleichzeitigen Verringerung der Genexpression endogener Gene führt, die für ein oder mehrere SSIII-, BEI- und BEII-Proteine codieren, oder die zu einer gleichzeitigen Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer SSIII-, BEI- und BEII-Proteine führt.

20 Die fremden Nukleinsäuremoleküle können hierbei zeitgleich („Cotransformation“) oder auch nacheinander, d.h. zeitlich aufeinanderfolgend („Supertransformation“) in das Genom der Pflanzenzelle eingeführt werden.

Die fremden Nukleinsäuremoleküle können auch in verschiedene individuelle Pflanzen  
25 einer Spezies eingeführt werden. Es können dabei Pflanzen erzeugt werden, bei welchen die Aktivität von einem Zielprotein oder zwei Zielproteinen (BEI, BEII, SSIII) reduziert ist. Durch anschließendes Kreuzen können dann Pflanzen erzeugt werden, bei welchen die Aktivität aller drei Zielproteine reduziert ist.

30 Weiterhin kann zur Einführung eines fremden Nukleinsäuremoleküls bzw. zur Erzeugung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder Pflanzen anstelle einer Wildtyp-Pflanzenzelle bzw. -Pflanze eine Mutante, die sich dadurch auszeichnet, dass sie bereits eine verminderte Aktivität für eines oder mehrerer Zielproteine (BEI, BEII, SSIII) aufweist, herangezogen werden. Bei den Mutanten kann es sich sowohl um

spontan auftretende Mutanten, als auch um solche handeln, die durch den gezielten Einsatz von Mutagenen erzeugt wurden. Möglichkeiten zur Erzeugung von solchen Mutanten sind weiter oben beschrieben worden.

- 5 Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und deren Stärke können durch die Verwendung der sogenannten Insertionsmutagenese (Übersichtsartikel: Thorneycroft et al., 2001, *Journal of experimental Botany* 52 (361), 1593-1601) hergestellt werden. Unter Insertionsmutagenese ist insbesondere das Inserieren von Transposons oder sogenannter transfer DNA (T-DNA) in ein Gen codierend für ein BEI Protein und/oder  
-10 BEII Protein und/oder ein SSIII Protein zu verstehen, wobei dadurch die Aktivität der besagten Proteine in der betreffenden Zelle reduziert wird.

- Bei den Transposons kann es sich dabei sowohl um solche handeln, die in der Zelle natürlicherweise vorkommen (endogene Transposons), als auch um solche, die  
15 natürlicherweise nicht in besagter Zelle vorkommen, sondern mittels gentechnischer Methoden, wie z.B. Transformation der Zelle, in die Zelle eingeführt wurden (heterologe Transposons). Die Veränderung der Expression von Genen mittels Transposons ist dem Fachmann bekannt. Eine Übersicht über die Nutzung von endogenen und heterologen Transposons als Werkzeuge in der Pflanzenbiotechnologie ist in  
20 Ramachandran und Sundaresan (2001, *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 234-252) dargestellt. Die Möglichkeit, Mutanten zu identifizieren, bei welchen spezifische Gene durch Transposoninsertionsmutagenese inaktiviert wurden, ist in einer Übersicht von Maes et al. (1999, *Trends in Plant Science* 4 (3), 90-96) dargestellt. Die Erzeugung von Reismutanten mit Hilfe endogener Transposons ist von Hirochika (2001, *Current*  
25 *Opinion in Plant Biology* 4, 118-122) beschrieben. Die Identifizierung von Maisgenen, mit Hilfe endogener Retrotransposons wird z.B. von Hanley et al. (2000, *The Plant Journal* 22 (4), 557-566) dargestellt. Die Möglichkeit Mutanten mit Hilfe von Retrotransposons herzustellen und Methoden, Mutanten zu identifizieren, sind von Kumar und Hirochika (2001, *Trends in Plant Science* 6 (3), 127-134) beschrieben. Die  
30 Aktivität von heterologen Transposons in unterschiedlichen Spezies, ist sowohl für dikotyledone, als auch für monokotyledone Pflanzen beschrieben worden: z.B. für Reis (Greco et al., 2001, *Plant Physiology* 125, 1175-1177; Liu et al., 1999, *Molecular and General Genetics* 262, 413-420; Hiroyuki et al., 1999, *The Plant Journal* 19 (5), 605-613; Jeon und Gynheung, 2001, *Plant Science* 161, 211-219), Gerste (2000, Koprek et

al., The Plant Journal 24 (2), 253-263) *Arabidopsis thaliana* (Aarts et al., 1993, Nature 363, 715-717, Schmidt und Willmitzer, 1989, Molecular and General Genetics 220, 17-24; Altmann et al., 1992, Theoretical and Applied Genetics 84, 371-383; Tissier et al., 1999, The Plant Cell 11, 1841-1852), Tomate (Belzile und Yoder, 1992, The Plant Journal 2 (2), 173-179) und Kartoffel (Frey et al., 1989, Molecular and General Genetics 217, 172-177; Knapp et al., 1988, Molecular and General Genetics 213, 285-290).

Grundsätzlich können die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen und die von ihnen produzierte Stärke sowohl mit Hilfe homologer, als auch heterologer Transposons hergestellt werden, wobei unter Verwendung von homologen Transposons auch solche zu verstehen sind, die bereits natürlicherweise im Pflanzengenom vorhanden sind.

Die T-DNA Insertionsmutagenese beruht darauf, dass bestimmte Abschnitte (T-DNA) von Ti-Plasmiden aus *Agrobacterium* in das Genom von pflanzlichen Zellen integrieren können. Der Ort der Integration in das pflanzliche Chromosom ist dabei nicht festgelegt, sondern kann an jeder beliebigen Stelle erfolgen. Integriert die T-DNA in einen Abschnitt des Chromosoms, der eine Genfunktion darstellt, so kann dieses zur Veränderung der Genexpression und damit auch zur Änderung der Aktivität eines durch das betreffende Gen codierte Protein führen. Insbesondere führt die Integration einer T-DNA in den codierenden Bereich eines Proteins häufig dazu, dass das entsprechende Protein von der betreffenden Zelle gar nicht mehr oder nicht mehr in aktiver Form synthetisiert werden kann. Die Verwendung von T-DNA Insertionen zur Erzeugung von Mutanten ist z.B. für *Arabidopsis thaliana* (Krysan et al., 1999, The Plant Cell 11, 2283-2290; Atipiroz-Leehan und Feldmann, 1997, Trends in genetics 13 (4), 152-156; Parinov und Sundaresan, 2000, Current Opinion in Biotechnology 11, 157-161) und Reis (Jeon und An, 2001, Plant Science 161, 211-219; Jeon et al., 2000, The Plant Journal 22 (6), 561-570) beschrieben. Methoden zur Identifizierung von Mutanten, die mit Hilfe der T-DNA Insertionsmutagenese erzeugt wurden, sind u.a. beschrieben von Young et al. (2001, Plant Physiology 125, 513-518), Parinov et al. (1999, The Plant cell 11, 2263-2270), Thorneycroft et al. (2001, Journal of Experimental Botany 52, 1593-1601), und McKinney et al. (1995, The Plant Journal 8 (4), 613-622).

Die T-DNA Mutagenese ist grundsätzlich zur Erzeugung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und der von diesen produzierten Stärke geeignet.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegende Erfindung führt das Vorhandensein und/oder die Expression eines oder mehrerer fremder Nukleinsäuremoleküle zur Inhibierung der Expression von endogenen Genen, die SSIII-Proteine, BEI-Proteine und  
 5 BEII-Proteine codieren.

Die Herstellung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen kann durch verschiedene, dem Fachmann bekannte Verfahren erzielt werden, z.B. durch solche, die zu einer Inhibierung der Expression endogener Gene führen, die ein SSIII-, BEI- bzw. BEII-Protein codieren. Hierzu zählen beispielsweise die Expression einer entsprechenden  
 10 antisense-RNA, oder eines doppelsträngigen RNA Konstruktes, die Bereitstellung von Molekülen oder Vektoren, die einen Cosuppressionseffekt vermitteln, die Expression eines entsprechend konstruierten Ribozyms, das spezifisch Transkripte spaltet, die ein SSIII-, BEI- bzw. BEII-Protein codieren, oder die sogenannte "in-vivo-Mutagenese".

15 Ferner kann die Verringerung der SSIII- und/oder der BEI- und/oder der BEII-Aktivität in den Pflanzenzellen auch durch die simultane Expression von sense und antisense RNA Molekülen des jeweiligen zu reprimierenden Zielgens, vorzugsweise des SSIII- und/oder des BEI- und/oder des BEII-Gens, hervorgerufen werden. Diese Methoden sind dem Fachmann geläufig.

20 Darüberhinaus ist bekannt, dass *in planta* die Bildung von doppelsträngigen RNA-Molekülen von Promotorsequenzen *in trans* zu einer Methylierung und einer transkriptionellen Inaktivierung homologer Kopien dieses Promotors führen kann (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201).

Weitere Verfahren zur Verringerung der Aktivität von Proteinen werden weiter unten  
 25 beschrieben.

Alle diese Verfahren basieren auf der Einführung eines fremden oder mehrerer fremder Nukleinsäuremoleküle in das Genom von Pflanzenzellen.

Zur Inhibierung der Genexpression mittels antisense- oder cosuppressions-Technologie  
 30 kann beispielsweise ein DNA-Molekül verwendet werden, das die gesamte für ein SSIII- und/oder BEI- und/oder BEII-Protein codierende Sequenz einschließlich eventuell vorhandener flankierender Sequenzen umfaßt, als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile lang genug sein müssen, um in den Zellen einen antisense-Effekt bzw. cosuppressions-Effekt zu bewirken. Geeignet

sind im allgemeinen Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp, vorzugsweise einer Länge von 100-500 bp, für eine effiziente antisense- bzw. cosuppressions-Inhibition insbesondere Sequenzen mit einer Länge über 500 bp.

- 5 Für antisense- oder cosuppressions-Ansätze geeignet ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Sequenzen haben, die SSIII-, BEI- bzw. BEII-Proteine codieren. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65 % sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Homologien von mindestens 90%, insbesondere zwischen 95% und 100% ist zu bevorzugen.

Ferner ist zur Erzielung eines antisense- oder eines cosuppressions-Effektes auch die Verwendung von Introns, d.h. von nicht-codierenden Bereichen von Genen, die für SSIII-, BEI- und/oder BEII-Proteine codieren, denkbar.

- 15 Die Verwendung von Intron-Sequenzen zur Inhibierung der Genexpression von Genen, die für Proteine der Stärkebiosynthese codieren, wurde beschrieben in den internationalen Patentanmeldungen WO97/04112, WO97/04113, WO98/37213, WO98/37214.

- 20 Dem Fachmann ist bekannt, wie er einen antisense- und einen cosuppressions- Effekt erzielen kann. Das Verfahren der cosuppressions-Inhibierung wurde beispielsweise beschrieben in Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui und Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621).

- 30 Auch die Expression von Ribozymen zur Verringerung der Aktivität von bestimmten Enzymen in Zellen ist dem Fachmann bekannt und ist beispielsweise beschrieben in EP-B1 0321201. Die Expression von Ribozymen in pflanzlichen Zellen wurde z.B. beschrieben in Feyter et al. (Mol. Gen. Genet. 250, (1996), 329-338).

Ferner kann die Verringerung der SSIII- und/oder der BEI- und/oder der BEII-Aktivität in den Pflanzenzellen auch durch die sogenannte "in vivo-Mutagenese" erreicht werden, bei der durch Transformation von Zellen ein hybrides RNA-DNA-Oligonucleotid

("Chimeroplast") in Zellen eingeführt wird (Kipp, P.B. et al., Poster Session beim " 5<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, 21.-27. September 1997, Singapore; R. A. Dixon und C.J. Arntzen, Meeting report zu "Metabolic Engineering in Transgenic Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15, (1997), 441-447; internationale Patentanmeldung WO 9515972; Kren et al., Hepatology 25, (1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al., Science 273, (1996), 1386-1389; Beetham et al., 1999, PNAS 96, 8774-8778).

Ein Teil der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids ist homolog zu einer Nukleinsäuresequenz eines endogenen SSIII-, BEI- und/oder BEII-Gens, weist jedoch im Vergleich zur Nukleinsäuresequenz eines endogenen SSIII-, BEI- und/oder BEII-Gens eine Mutation auf oder enthält eine heterologe Region, die von den homologen Regionen umschlossen ist.

Durch Basenpaarung der homologen Regionen des RNA-DNA-Oligonucleotids und des endogenen Nukleinsäuremoleküls, gefolgt von homologer Rekombination, kann die in der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids enthaltene Mutation oder heterologe Region in das Genom einer Pflanzenzelle übertragen werden. Dies führt zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer SSIII-, BEI- und/oder BEII-Proteine.

Ferner kann die Verringerung der SSIII- und/oder der BEI- und/oder der BEII-Aktivität in den Pflanzenzellen auch durch die simultane Expression von sense und antisense RNA Molekülen des jeweiligen zu reprimierenden Zielgens, vorzugsweise des SSIII- und/oder des BEI- und/oder des BEII-Gens, hervorgerufen werden.

Dies kann beispielsweise durch die Verwendung von chimären Konstrukten erreicht werden, die „inverted repeats“ des jeweiligen Zielgens oder Teilen des Zielgens enthalten. Hierbei codieren die chimären Konstrukte für sense und antisense RNA Moleküle des jeweiligen Zielgens. Sense und antisense RNA werden *in planta* gleichzeitig als ein RNA-Molekül synthetisiert, wobei sense und antisense RNA durch einen Spacer voneinander getrennt sein und ein doppelsträngiges RNA-Molekül bilden können.

Es konnte gezeigt werden, dass die Einführung von inverted-repeat-DNA-Konstrukten in das Genom von Pflanzen eine sehr effiziente Methode ist, um die zu den inverted-repeat-DNA-Konstrukten korrespondierenden Gene zu reprimieren (Waterhouse et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, (1998), 13959-13964; Wang and Waterhouse, Plant Mol. Biol. 43, (2000), 67-82; Singh et al., Biochemical Society Transactions Vol. 28 part 6

(2000), 925- 927; Liu et al., Biochemical Society Transactions Vol. 28 part 6 (2000), 927-929); Smith et al., (Nature 407, (2000), 319-320; internationale Patentanmeldung WO99/53050 A1). Sense und antisense Sequenzen des Zielgens bzw. der Zielgene können auch getrennt voneinander mittels gleicher oder unterschiedlicher Promotoren exprimiert werden (Nap, J-P et al, 6<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, 5 Quebec, 18.-24. Juni, 2000; Poster S7-27, Vortrag Session S7).

Die Verringerung der SSIII- und/oder der BEI- und/oder der BEII-Aktivität in den Pflanzenzellen kann somit auch durch die Erzeugung doppelsträngiger RNA-Moleküle von SSIII- und/oder BEI- und/oder BEII-Genen erreicht werden. Vorzugsweise werden hierzu „inverted repeats“ von DNA-Molekülen von SSIII- und/oder BEI- und/oder BEII-Genen oder -cDNAs in das Genom von Pflanzen eingeführt, wobei die zu transkribierenden DNA-Moleküle (SSIII-, BEI- oder BEII-Gen oder -cDNA oder Fragmente dieser Gene oder cDNAs) unter Kontrolle eines Promotors stehen, der die Expression besagter DNA-Moleküle steuert.

Darüberhinaus ist bekannt, dass die Bildung von doppelsträngigen RNA-Molekülen von Promotor-DNA-Molekülen in Pflanzen *in trans* zu einer Methylierung und einer transkriptionellen Inaktivierung homologer Kopien dieser Promotoren führen kann, die im folgenden als Zielpromotoren bezeichnet werden sollen (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201).

Über die Inaktivierung des Zielpromotors ist es somit möglich, die Genexpression eines bestimmten Zielgens (z.B. SSIII-, BEI oder BEII-Gen), das natürlicherweise unter der Kontrolle dieses Zielpromotors steht, zu verringern.

D.h., die DNA-Moleküle, die die Zielpromotoren der zu reprimierenden Gene (Zielgene) umfassen, werden in diesem Fall, im Gegensatz zur ursprünglichen Funktion von Promotoren in Pflanzen, nicht als Steuerelemente zur Expression von Genen oder cDNAs, sondern selbst als transkribierbare DNA-Moleküle verwendet.

Zur Erzeugung der doppelsträngigen Zielpromotor-RNA-Moleküle *in planta*, die dort als RNA-Haarnadel-Moleküle (RNA hairpin) vorliegen können, werden vorzugsweise Konstrukte verwendet, die „inverted repeats“ der Zielpromotor-DNA-Moleküle enthalten, wobei die Zielpromotor-DNA-Moleküle unter Kontrolle eines Promotors stehen, der die Genexpression besagter Zielpromotor-DNA-Moleküle steuert. Anschließend werden diese Konstrukte in das Genom von Pflanzen eingeführt. Die Expression der „inverted



repeats“ besagter Zielpromotor-DNA-Moleküle führt *in planta* zur Bildung doppelsträngiger Zielpromotor-RNA-Moleküle (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201). Hierdurch kann der Zielpromotor inaktiviert werden.

Die Verringerung der SSIII- und/oder der BEI- und/oder der BEII-Aktivität in den Pflanzenzellen kann somit auch durch die Erzeugung doppelsträngiger RNA-Moleküle von Promotorsequenzen von SSIII- und/oder BEI- und/oder BEII-Genen erreicht werden. Vorzugsweise werden hierzu „inverted repeats“ von Promotor-DNA-Molekülen von SSIII- und/oder BEI- und/oder BEII-Promotoren in das Genom von Pflanzen eingeführt, wobei die zu transkribierenden Zielpromotor-DNA-Moleküle (SSIII-, BEI- und/oder BEII-Promotor) unter Kontrolle eines Promotors stehen, der die Expression besagter Zielpromotor-DNA-Moleküle steuert.

Ferner ist dem Fachmann bekannt, dass er die Aktivität eines oder mehrerer SSIII-, BEI- und/oder BEII-Proteine durch die Expression von nicht-funktionellen Derivaten insbesondere trans-dominanten Mutanten solcher Proteine und/oder durch die Expression von Antagonisten/Inhibitoren solcher Proteine erreichen kann.

Antagonisten/Inhibitoren solcher Proteine umfassen beispielsweise Antikörper, Antikörperfragmente oder Moleküle mit ähnlichen Bindungseigenschaften. Beispielsweise wurde ein cytoplasmatischer scFv Antikörper eingesetzt, um die Aktivität des Phytochrom A Proteins in gentechnisch veränderten Tabakpflanzen zu modulieren (Owen, Bio/Technology 10 (1992), 790-4; Review: Franken, E, Teuschel, U. und Hain, R., Current Opinion in Biotechnology 8, (1997), 411-416; Whitelam, Trends Plant Sci. 1 (1996), 268-272).

Sinnvolle Promotoren für die Expression von Nukleinsäuren, die die Aktivität eines Zielgens verringern, sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, der Patatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29), der MCPI-Promotor des Metalloprotease-Inhibitor-Gens aus Kartoffel (ungarische Patentanmeldung HU9801674) oder der GBSSI-Promotor aus Kartoffel (internationale Patentanmeldung WO 92/11376) für eine knollenspezifische Expression in Kartoffeln oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451), der Ca/b-Promotor (s. beispielsweise

US 5656496, US 5639952, Bansal et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, (1992), 3654-3658) und der Rubisco SSU-Promotor (s. beispielsweise US 5034322, US 4962028) oder für eine endosperm-spezifische Expression der Glutelin-Promotor (Leisy et al., Plant Mol. Biol. 14, (1990), 41-50; Zheng et al., Plant J. 4, (1993), 357-366; Yoshihara et al., FEBS Lett. 383, (1996), 213-218), der Shrunken-1 Promotor (Werr et al., EMBO J. 4, (1985), 1373-1380), der HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolinpromotor oder Promotoren von Zein-Genen aus Mais (Pedersen et al., Cell 29, (1982), 1015-1026; Quatroccio et al., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93).

Die Expression des fremden Nukleinsäuremoleküls (der fremden Nukleinsäuremoleküle) ist insbesondere in solchen Organen der Pflanze von Vorteil, die Stärke speichern. Solche Organe sind z.B. die Knolle der Kartoffelpflanze oder die Körner bzw. das Endosperm von Mais-, Weizen- oder Reispflanzen. Bevorzugt werden daher Promotoren verwendet, die die Expression in diesen Organen vermitteln.

Es können jedoch auch Promotoren verwendet werden, die nur zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt aktiviert werden (siehe beispielsweise WO 93/07279). Von besonderem Interesse können hierbei Promotoren von heat-shock Proteinen sein, die eine einfache Induktion erlauben. Ferner können samenspezifische Promotoren, wie z.B. der USP-Promoter aus *Vicia faba*, der eine samenspezifische Expression in *Vicia faba* und anderen Pflanzen gewährleistet (Fiedler et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 669-679; Bäumlein et al., Mol. Gen. Genet. 225, (1991), 459-467). Ferner können auch fruchtspezifische Promotoren eingesetzt werden, wie z.B. beschrieben in der WO91/01373.

Weiterhin kann eine Terminationssequenz vorhanden sein, die der korrekten Beendigung der Transkription dient sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. z.B. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen synthetisieren eine modifizierte Stärke, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Amylosegehalt bzw. dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Phosphatgehalt, dem Viskositätsverhalten, der Gelfestigkeit, der Stärkekorngröße und/oder der Stärkekornmorphologie im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist, so dass diese für spezielle Verwendungszwecke besser geeignet ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanzenzelle, insbesondere eine transgene Pflanzenzelle, die eine modifizierte Stärke synthetisiert.

5

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass bei den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen die Zusammensetzung der Stärke in der Weise verändert ist, dass sie einen Amylosegehalt von mindestens 30% und einen erhöhten Phosphatgehalt und in der RVA Analyse eine erhöhte Endviskosität im Vergleich zu Stärke aus Pflanzenzellen von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen aufweist, so dass diese Stärke für spezielle Verwendungszwecke besser geeignet ist.

Die erfindungsgemäßen Stärken weisen insbesondere den Vorteil auf, dass sie trotz des erhöhten Amylosegehaltes unter Standardbedingungen vollständig verkleistern. Dadurch wird die Verarbeitbarkeit der Stärke gegenüber anderen Stärken mit erhöhtem Amylosegehalt deutlich verbessert. Es ist daher zum Gelatinisieren der erfindungsgemäßen Stärke keine erhöhte Temperatur oder erhöhter Druck notwendig. Daher kann zum Aufschluß dieser Stärken auf den Einsatz spezieller Geräte wie z.B. Jetcooker, Extruder oder Autoklaven verzichtet werden. Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Stärken liegt darin, dass sie bei Verarbeitungsprozessen mit Heißwalzen als Suspension auf diese aufgebracht werden können. Andere Stärken mit erhöhtem Amylosegehalt würden bei dieser Verarbeitung, wenn überhaupt, nur begrenzt verkleistern und daher auch nicht als Paste oder Film auf die entsprechenden Walzen aufgebracht werden können.

Besonders geeignet sind die erfindungsgemäßen Stärken für alle Anwendungen, bei welchen die Dickungsleistung, die Geliereigenschaften oder die Bindungseigenschaften zugesetzter Substanzen von Bedeutung sind. Daher eignet sich die erfindungsgemäße Stärke besonders zur Herstellung von Lebensmitteln wie z.B. Backwaren, Fertignahrungsmitteln (Instant Food), Pudding, Suppen, Konfekt, Schokolade, Eiskrem, Panaden für Fisch- oder Fleisch, gefrorene Desserts oder extrudierte Snacks. Weiterhin ist die erfindungsgemäße Stärke geeignet für die Herstellung von Klebstoffen, Anwendungen bei der Textilverarbeitung, als Zusatz zu Baustoffen, für Anwendungen im Bereich der Tierernährung, als Zusatzstoff für Kosmetika und in der Papierverarbeitung.

Insbesondere eignet sich die Stärke, welche aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen isoliert wurde zur Herstellung von Quellstärken.

Quellstärken sind physikalisch modifizierte Stärken, die vorwiegend durch naßthermischen Aufschluß hergestellt werden. Im Unterschied zu nativer Stärke bilden sie mit kaltem Wasser Dispersionen bzw. Pasten oder Gele, je nach eingesetzter Konzentration der Quellstärke und in Abhängigkeit von der zur Herstellung der Quellstärke verwendeten Stärkeart. Aufgrund dieser Eigenschaften ergeben sich für Quellstärken eine Reihe von Anwendungsmöglichkeiten in der Lebensmittelindustrie und außerdem in vielen technischen Bereichen. Die Verwendung von Quellstärke, die auch als kaltquellende Stärke bezeichnet wird, anstelle von nativer Stärke hat in verschiedenen Fällen den Vorteil, dass Produktionsverfahren vereinfacht und verkürzt werden können.

Für die Herstellung beispielsweise von Instant-Desserts und -Puddings werden Quellstärken benötigt, die nach dem Einrühren in kalte Flüssigkeit, wie z.B. Wasser oder Milch, innerhalb kurzer Zeit schnittfeste Gele bilden, wie beispielsweise im Falle eines Kochpuddings. Diese Anforderungen erfüllen die kommerziellen Quellstärken aus Weizen-, Kartoffel- oder Maisstärke nicht. Zur Erzielung der vorgenannten Eigenschaften sind bei den bisher kommerziell verfügbaren Quellstärken Zusätze zur Quellstärke wie Gelatine, Alginat, Carrageenan (Carrageen) und/oder anorganische Salze notwendig. Dieses Zusetzen von sogenannten Hilfsstoffen ist z.B. nach Herstellung von Quellstärken mit erfindungsgemäßen Stärken, isoliert aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen nicht notwendig.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch eine erfindungsgemäße Pflanzenzelle, die eine modifizierte Stärke mit veränderter Stärkekornmorphologie aufweist.

Unter dem Begriff Stärkekornmorphologie soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Größe, und die Oberflächenstruktur von nativen Stärkekörnern verstanden werden. Stärke wird in den Speicherorganen wie z.B. Knollen, Wurzeln, Embryonen oder Endosperm von Pflanzen als kristalline Struktur in granulärer Form gespeichert. Stärkekörner, bei welchen diese granulären Strukturen nach Isolierung der Stärke aus Pflanzenzellen erhalten bleiben, werden als native Stärke bezeichnet. Die mittlere Korngröße (bestimmt nach der weiter unten beschriebenen Methode) der erfindungsgemäßen nativen Stärke ist deutlich geringer, als diejenige von nativer Stärke, die aus Wildtyp-Pflanzen isoliert wurde. In der Aufnahme mit dem

Rasterelektronenmikroskop (siehe Fig. 4 und 5) ist deutlich zu erkennen, dass erfindungsgemäße native Stärkekörner überraschenderweise eine raue Oberfläche mit vielen Poren aufweisen. Die Oberflächenstruktur von nativen Stärkekörnern, isoliert aus Wildtyp-Pflanzen, zeigt hingegen eine überwiegend glatte Struktur, die keine Poren erkennen läßt.

Sowohl das Vorliegen von kleineren Körnern, als auch die raue, mit Poren versehene Oberfläche führen dazu, dass die Oberfläche von erfindungsgemäßen Stärkekörnern bei gleichem Volumen wesentlich größer ist, als diejenige von Stärkekörnern, isoliert aus Wildtyp-Pflanzen. Dadurch eignet sich die erfindungsgemäße Stärke besonders gut für den Einsatz als Trägerstoff für z.B. Geschmackstoffe, pharmakologisch aktive Substanzen, präbiotische Substanzen, probiotische Mikroorganismen, Enzyme oder Farbstoffe. Auch zum Koagulieren von Substanzen und in der Papierherstellung sind diese Stärken besonders geeignet.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit für die erfindungsgemäßen Stärken findet sich auf dem Gebiet der Förderung von Rohstoffen unter Einsatz von Bohrern. So ist es z.B. bei der Förderung von Rohöl notwendig, Hilfstoffe und/oder Schmiermittel einzusetzen, die eine Überhitzung des Bohrers, bzw. des Bohrgestänges vermeiden. Durch ihre besonderen Gelatinisierungseigenschaften ist die erfindungsgemäße Stärke daher auch für die Anwendung auf diesem Gebiet besonders geeignet.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch eine erfindungsgemäße Pflanzenzelle, die eine modifizierte Stärke mit einem Amylosegehalt von mindestens 30% enthält und im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen einen erhöhten Phosphatgehalt und in der RVA Analyse erhöhte Endviskosität aufweist.

Der Amylosegehalt wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung nach der weiter unten für Kartoffelstärke beschriebenen Methode von Hovenkamp-Hermelink et al. (Potato Research 31, (1988), 241-246) bestimmt. Diese Methode ist auch auf isolierte Stärken anderer Pflanzenspezies anwendbar. Verfahren zur Isolierung von Stärken sind dem Fachmann bekannt.

Der Begriff „Phosphatgehalt“ der Stärke bezeichnet im Sinne der vorliegenden Erfindung den Gehalt an kovalent in Form von Stärkephosphatmonoestern gebundenem Phosphat.

Der Begriff „erhöhter Phosphatgehalt“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass der Gesamtposphatgehalt an kovalent gebundenem Phosphat und/oder der Phosphatgehalt in C-6-Position der in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen synthetisierten Stärke erhöht ist, vorzugsweise um mindestens 270%, weiter bevorzugt um mindestens 300%, besonders bevorzugt um mindestens 350% erhöht ist im Vergleich zu Stärke aus Pflanzenzellen von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen.

Unter dem Begriff „Phosphatgehalt in C6-Position“ versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung den Gehalt an Phosphatgruppen, die an Kohlenstoffatomposition „6“ der Glukosemonomere der Stärke gebunden sind. Grundsätzlich können in der Stärke *in vivo* die Positionen C2, C3 und C6 der Glukoseeinheiten phosphoryliert sein. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kann die Bestimmung des Phosphatgehaltes in C6-Position (= C6-P-Gehalt) über eine Glukose-6-phosphat-Bestimmung mittels eines optisch-enzymatischen Tests (Nielsen et al., Plant Physiol. 105, (1994), 111-117) erfolgen (siehe unten).

Unter dem Begriff „Gesamtposphatgehalt“ der Stärke versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung den Gehalt an kovalent in Form von Stärkephosphatmonoestern gebundenem Phosphat in C2-, C3- und C6-Position der Glukoseeinheiten. Der Gehalt an phosphorylierten Nicht-Glukanen, wie z.B. Phospholipiden, ist erfindungsgemäß von dem Begriff „Gesamtposphatgehalt“ nicht umfaßt. Phosphorylierte Nicht-Glukane müssen daher vor Bestimmung des Gesamtposphatgehaltes quantitativ abgetrennt werden. Verfahren zur Trennung der phosphorylierten Nicht-Glukane (z.B. Phospholipide) von der Stärke sind dem Fachmann bekannt. Methoden zur Bestimmung des Gesamtposphatgehaltes sind dem Fachmann bekannt und unten beschrieben.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen eine Stärke, die in C6-Position der Glukosemonomere der Stärke einen

Phosphatgehalt von 40 – 120 nmol, insbesondere von 60 – 110 nmol, bevorzugt von 80 – 100 C6-P pro mg Stärke aufweisen.

Ein Protokoll zur Durchführung der RVA Analyse ist weiter unten beschrieben.

5 Insbesondere ist darauf hinzuweisen, dass in der RVA Analyse von Kartoffelstärken häufig eine 8%ige Stärkesuspension (w/w) eingesetzt wird. In den zum Gerät „RVAsuper3“ beigefügten Unterlagen (Gebrauchsanweisung, Newport Scientific Pty Ltd., Investment Support Group, Warriewood NSW 2102, Australien) wird eine Suspension enthaltend ca. 10% Stärke zur Analyse von Kartoffelstärke empfohlen.

10 Überraschenderweise wurde im Falle der Stärke aus Kartoffelpflanzen, betreffend die vorliegende Erfindung, gefunden, dass die Verwendung einer 8%igen Stärkesuspension (2g Stärke in 25 ml Wasser) für die Analyse nicht möglich war, weil die Endviskosität Werte erreichte, die von dem Gerät nicht mehr erfasst werden konnten. Darum wurden für die RVA Analyse anstelle von 8%igen Stärkesuspensionen nur 6%ige  
15 Stärkesuspensionen (1,5g Stärke in 25 ml Wasser) eingesetzt. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung soll daher unter erhöhter Endviskosität in der RVA Analyse eine Erhöhung um mindestens 150%, besonders um mindestens 200%, insbesondere um mindestens 250% gegenüber nicht genetisch modifizierten Wildtyp Pflanzen verstanden werden. Die Erhöhung der Endviskositäten ist dabei auf 6%ige  
20 Stärkesuspensionen zu beziehen.

Weiterhin soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Kartoffelstärke verstanden werden, die eine Endviskosität in der RVA Analyse mit 6%igem Stärkegehalt von mindestens 300 RVU, besonders von 400 RVU, insbesondere von 500 RVU aufweisen. Auf die Bestimmung der RVUs wird nachstehend noch  
25 eingegangen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzenzellen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, die nach Verkleisterung in Wasser ein Gel bildet, das im Vergleich zu einem Gel aus Stärke von  
30 entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine erhöhte Gelfestigkeit aufweist.

Unter dem Begriff „erhöhte Gelfestigkeit“ versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung der Gelfestigkeit, vorzugsweise um mindestens 300%,

insbesondere um mindestens 500%, weiter bevorzugt um mindestens 700% und besonders bevorzugt um mindestens 800%, maximal um höchstens 2000% oder um höchstens 1500% im Vergleich zur Gelfestigkeit von Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.

- 5 Die Bestimmung der Gelfestigkeit soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung mit Hilfe eines Texture Analyzers unter den unten beschriebenen Bedingungen erfolgen.

Um Stärkegele herzustellen muß die kristalline Struktur von nativer Stärke zunächst durch Erhitzen in wässriger Suspension unter ständigem Rühren zerstört werden.

- 10 Dieses wurde mit Hilfe eines Rapid Visco Analyser (Newport Scientific Pty. Ltd., Investmet Support Group, Warriewood NSW 2102, Australien) durchgeführt. Wie weiter oben bereits ausgeführt, wurde dabei für Stärke aus Kartoffelpflanzen nur eine 6%ige Stärkesuspension anstatt einer 8%igen eingesetzt, weil die Endviskositäten der 8%igen Suspensionen von dem Gerät nicht mehr erfasst werden konnten. Zur Bestimmung der
- 15 Gelfestigkeit werden die im Rapid Visco Analyser verkleisterten Stärkesuspensionen für eine gewisse Zeit gelagert und dann einer Analyse mit einem Texture Analyser unterzogen. Folglich sind auch zur Bestimmung der Gelfestigkeit 6%ige anstelle von 8%igen verkleisterten Stärkesuspensionen eingesetzt worden.

- 20 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegende Erfindung zeichnet sich die in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen synthetisierte modifizierte Stärke nicht nur durch einen im Vergleich zu Stärke von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen erhöhten Amylosegehalt und einen erhöhten Phosphatgehalt und eine erhöhte Endviskosität in der RVA Analyse aus, sondern auch durch eine veränderte Seitenkettenverteilung.

- 25 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung somit erfindungsgemäße Pflanzenzellen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie eine veränderte Seitenkettenverteilung aufweist.

- 30 Unter dem Begriff "veränderte Seitenkettenverteilung" soll in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine Verringerung des Anteils an kurzen Seitenketten mit einem DP (= Degree of Polymerisation) von 6 bis 11 um mindestens 10%, bevorzugt um mindestens 15%, insbesondere um mindestens 30% und besonders bevorzugt um



mindestens 50% im Vergleich zum Anteil an kurzen Seitenketten mit einem DP von 6 bis 11 von Amylopektin aus Wildtyp-Pflanzen verstanden werden und/oder eine Erhöhung des Anteils an kurzen Seitenketten mit einem DP von 16 bis 22 um mindestens 5%, bevorzugt um mindestens 10%, insbesondere um mindestens 15% und besonders bevorzugt um mindestens 30% im Vergleich zum Anteil an kurzen Seitenketten mit einem DP von 16 bis 22 von Amylopektin aus Wildtyp-Pflanzen.

Die Bestimmung des Anteils an kurzen Seitenketten erfolgt über die Bestimmung des prozentualen Anteils einer bestimmten Seitenkette am Gesamtanteil aller Seitenketten. Der Gesamtanteil aller Seitenketten wird ermittelt über die Bestimmung der Gesamtfläche unter den Peaks, die im HPLC-Chromatogramm die Polymerisationsgrade von DP 6 bis 26 repräsentieren. Der prozentuale Anteil einer bestimmten Seitenkette am Gesamtanteil aller Seitenketten wird ermittelt über die Bestimmung des Verhältnisses der Fläche unter dem Peak, der diese Seitenkette im HPLC-Chromatogramm repräsentiert, zur Gesamtfläche. Zur Bestimmung der Peakflächen kann beispielsweise das Programm Chromelion 6.20 der Firma Dionex, USA, verwendet werden.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zeichnet sich die in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen synthetisierte modifizierte Stärke nicht nur durch einen im Vergleich zu Stärke von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen erhöhten Amylosegehalt und einen erhöhten Phosphatgehalt und eine erhöhte Endviskosität in der RVA Analyse aus, sondern auch durch ein verändertes „Seitenkettenprofil DP 12 bis 18“ und/oder durch ein verändertes „Seitenkettenprofil DP 19 bis 24“ und/oder durch ein verändertes „Seitenkettenprofil DP 25 bis 30“ und/oder durch ein verändertes „Seitenkettenprofil DP 37 bis 42“ und/oder durch ein verändertes „Seitenkettenprofil DP 62 bis 123“ aus.

Unter dem Begriff verändertes „Seitenkettenprofil DP 12 bis 18“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Verringerung des Anteils von Seitenketten des Amylopektins mit einem DP von 12 bis 18 um mindestens 25%, bevorzugt um mindestens 35%, besonders bevorzugt um mindestens 45% und ganz besonders bevorzugt um mindestens 55% im Vergleich zum Anteil an Seitenketten mit einem DP von 12 bis 18 von Amylopektin aus Wildtyp-Pflanzen verstanden werden.

Unter dem Begriff verändertes „Seitenkettenprofil DP 19 bis 24“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Verringerung des Anteils von Seitenketten des Amylopektins mit einem DP von 19 bis 24 um mindestens 10%, bevorzugt von  
5 mindestens 20% und besonders bevorzugt von mindestens 30% im Vergleich zum Anteil an Seitenketten mit einem DP von 19 bis 24 von Amylopektin aus Wildtyp-Pflanzen verstanden werden.

Unter dem Begriff verändertes „Seitenkettenprofil DP 25 bis 30“ soll im Zusammenhang  
10 mit der vorliegenden Erfindung eine Verringerung des Anteils von Seitenketten des Amylopektins mit einem DP von 25 bis 30 um mindestens 5% im Vergleich zum Anteil an Seitenketten mit einem DP von 25 bis 30 von Amylopektin aus Wildtyp-Pflanzen verstanden werden.

15 Unter dem Begriff verändertes „Seitenkettenprofil DP 37 bis 42“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung des Anteils von Seitenketten des Amylopektins mit einem DP von 37 bis 42 um mindestens 5%, bevorzugt um mindestens 10% und besonders bevorzugt um mindestens 15% im Vergleich zum  
20 Anteil an Seitenketten mit einem DP von 37 bis 42 von Amylopektin aus Wildtyp-Pflanzen verstanden werden.

Unter dem Begriff verändertes „Seitenkettenprofil DP 62 bis 123“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung des Anteils von  
25 Seitenketten des Amylopektins mit einem DP von 62 bis 123 um mindestens 20%, bevorzugt um mindestens 35%, besonders bevorzugt um mindestens 50% im Vergleich zum Anteil an Seitenketten mit einem DP von 62 bis 123 von Amylopektin aus Wildtyp-Pflanzen werden.

Die Bestimmung des Seitenkettenprofils erfolgt über die Bestimmung des prozentualen  
30 Anteils einer bestimmten Gruppe von Seitenketten am Gesamtanteil aller Seitenketten im GPC-Chromatogramm. Die Gesamtfläche unterhalb der Linie des GPC-Chromatogramms wird dazu in einzelne Abschnitte unterteilt, die jeweils Gruppen von Seitenketten unterschiedlicher Länge repräsentieren. Die gewählten Abschnitte enthalten Seitenketten mit folgendem Polymerisierungsgrad (DP = Anzahl der

Glukosemonomere innerhalb einer Seitenkette):  $DP \leq 11$ , DP12-18, DP19-24, DP25-30, DP31-36, DP37-42, DP43-48, DP49-55, DP56-61 und DP62-123. Um das Elutionsvolumen mit der Molmasse zu korrelieren wird die verwendete GPC-Säule mit Dextranstandards ((Fluka, Product# 31430) kalibriert. Die verwendeten Dextrane, ihre zugehörige Molmasse und die Elutionsvolumina sind in Fig 9 dargestellt. Mit der daraus resultierenden Kalibrierungsgeraden wird das Elutionsdiagramm als Molekulargewichtsverteilung dargestellt. Zur Festlegung des Molekulargewichts der einzelnen Seitenketten wurde für Glukose ein Molekulargewicht von 162 festgelegt. Die gesamte Fläche unterhalb der Linie im GPC Chromatogramm, wird als 100% festgesetzt und der Anteil der Flächen der einzelnen Abschnitte bezogen auf den Anteil der Gesamtfläche berechnet.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform weißt das Amylopektin von erfindungsgemäßer Stärke, aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen eine Erhöhung des Anteils der Seitenketten des Amylopektins mit einem DP von größer als 123 im Vergleich zum Anteil an Seitenketten mit einem DP von größer als 123 von Amylopektin aus Wildtyp-Pflanzen auf.

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen können zur Regeneration ganzer Pflanzen verwendet werden.

Die durch Regeneration der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen erhältlichen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen können zu jeder beliebigen Pflanzenspezies gehören, d.h. sowohl zu monokotyledonen als auch zu dikotyledonen Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Pflanzenzellen aus landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, d.h. aus Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Vorzugsweise betrifft die Erfindung faserbildende (z.B. Flachs, Hanf, Baumwolle), ölspeichernde (z.B. Raps, Sonnenblume, Sojabohne), zuckerspeichernde (z.B. Zuckerrübe, Zuckerrohr, Zuckerhirse) und proteinspeichernde Pflanzen (z.B. Leguminosen).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Futterpflanzen, insbesondere Futter- und Weidegräser (Alfalfa, Klee etc.), und Gemüsepflanzen (z.B. Tomate, Salat, Chicoree).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Pflanzenzellen aus  
 5 stärkepeichernden Pflanzen (z.B. Weizen, Gerste, Hafer, Roggen, Kartoffel, Mais, Reis, Erbse, Maniok), besonders bevorzugt sind Pflanzenzellen aus Kartoffel.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher  
 10 Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung der DNA mittels des biolistischen Ansatzes sowie weitere Möglichkeiten.

Die Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation von Pflanzenzellen ist  
 15 intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, IN: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 und bei An et al. EMBO J. 4, (1985), 277-287 beschrieben worden. Für die Transformation von Kartoffel, siehe z.B. Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8, (1989), 29-33.).

20 Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels auf Agrobakterium Transformation basierender Vektoren wurde beschrieben (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng et al, Science in China 33, (1990), 28-34; Wilmerk et al., Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80; May et al.,  
 25 Bio/Technology 13, (1995), 486-492; Conner und Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie et al, Transgenic Res. 2, (1993), 252-265). Alternatives System zur Transformation von monokotylen Pflanzen ist die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, Plant Physiol. 104, (1994), 37-48; Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24, (1994), 317-325;  
 30 Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631), die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wird in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z. B. WO95/06128, EP0513849, EP0465875, EP0292435; Fromm et al., Biotechnology 8, (1990), 833-844; Gordon-

Kamm et al., Plant Cell 2, (1990), 603-618; Koziel et al., Biotechnology 11 (1993), 194-200; Moroc et al., Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726).

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.; Krens et al., Nature 296, 5 (1982), 72-74) und für Weizen (Nehra et al., Plant J. 5, (1994), 285-297). Alle vorstehenden Methoden sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet.

Generell kommt für die Expression des fremden Nukleinsäuremoleküls (der fremden Nukleinsäuremoleküle) jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage. Der Promotor kann dabei so gewählt sein, dass die Expression in den erfindungsgemäßen 10 Pflanzen konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. In Bezug auf die Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein.

15 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird zur Reduzierung der Aktivität eines oder mehrerer SSIII-Proteine und/oder BEI-Proteine und/oder BEII-Proteine in pflanzlichen Zellen mindestens eine antisense-RNA exprimiert.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch eine erfindungsgemäße 20 Pflanzenzelle, worin besagte fremde Nukleinsäuremoleküle ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- 25 a) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen bewirkt, das SSIII-Proteine und/oder BEI-Proteine und/oder BEII-Proteine codiert;
- b) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen führen, das SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codiert;
- 30 c) DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von mindestens einem endogenen Gen spaltet, das SSIII-Proteine und/oder BEI-Proteine und/oder BEII-Proteine codiert; und
- d) Mittels in vivo-Mutagenese eingeführte Nukleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem endogenen SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e)

codierenden Gen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression von mindestens einem SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codierenden Gen bewirkt, oder die Synthese von inaktiven SSIII- und/oder BEI- und/oder BEII-Proteinen;

- 5 e) DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen bewirkt, das SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codiert;
- 10 f) DNA-Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration der Transposonsequenzen zu einer Mutation oder einer Insertion in mindestens einem endogenen SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codierenden Gen führt, welche zu einer Verringerung der Expression von mindestens einem SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codierenden Gen bewirkt, oder die Synthese von inaktiven SSIII- und/oder BEI- und/oder BEII-Proteinen zur Folge hat; und
- 15 g) T-DNA-Moleküle, die durch Insertion in mindestens einem endogenen SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codierenden Gen eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codierenden Gen bewirkt, oder die Synthese von inaktiven SSIII- und/oder BEI- und/oder BEII-Proteinen zur Folge haben.
- 20

25 Nach einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Vermehrungsmaterial jeglicher Art von erfindungsgemäßen Pflanzen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung der hierin beschriebenen Nukleinsäuremoleküle zur Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen.

30 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Zusammensetzung, enthaltend mindestens eines der vorstehenden Nukleinsäuremoleküle, wobei das mindestens eine Nukleinsäuremolekül nach Einführung in eine Pflanzenzelle zur Verringerung mindestens eines endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden SSIII-

Proteins und mindestens eines endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEII-Proteins, und vorzugsweise weiterhin zur Verringerung mindestens eines endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEI-Proteins führt. Die Zusammensetzung kann ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte (vgl. oben) enthalten.

5

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen zur Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen sowie eine Wirtszelle, insbesondere eine Pflanzenzelle, enthaltend die erfindungsgemäße Zusammensetzung.

10

Noch ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Transformationssystem für Pflanzenzellen, enthaltend mindestens ein Nukleinsäuremolekül und mindestens eine Pflanzenzelle, wobei das mindestens eine Nukleinsäuremolekül zur Verringerung der Aktivität jeweils mindestens eines der endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden SSIII-, BEI- und BE-II-Proteine führt, soweit diese nicht bereits durch eine vorherige genetische Modifikation der besagten Pflanzenzelle in ihrer Aktivität verringert wurden. Unter "Transformationssystem" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung also eine Kombination aus mindestens einer zu transformierenden Pflanzenzelle und mindestens einem zur Transformation verwendeten Nukleinsäuremolekül wie vorstehend beschrieben verstanden. Es können weitere, dem Fachmann auf dem Gebiet der Transformation von Pflanzenzellen geläufige Komponenten, die bei der Transformation nützlich sind, einschließlich von Puffern und dergleichen, im erfindungsgemäßen Transformationssystem enthalten sein.

25

### **Beschreibung der Abbildungen**

Fig 1:

Graphische Darstellung der Viskositätseigenschaften von Stärke aus Kartoffelpflanzen.

- 5 Die Analyse wurde mit einem Rapid Visco Analyser (Newport Scientific Pty Ltd., Investmet Support Group, Warriewood NSW 2102, Australien) durchgeführt. Die Bedingungen, unter welchen die Analyse durchgeführt wurde, sind unter RVA-Analysemethode 1 im Abschnitt „Allgemeine Methoden“ beschrieben. Die untersuchte Stärke wurde aus Knollen von Wildtyp-Pflanzen (WT), Pflanzen mit einer reduzierten
- 10 Aktivität eines SSIII-Proteins und eines BEI-Proteins (038VL008 und 038VL107) oder aus Pflanzen, die eine reduzierte Aktivität eines SSIII-Proteins und eines BEI-Proteins und eines BEII-Proteins (110CF003 und 108CF041) aufweisen, isoliert. Die Isolierung der Stärke erfolgte nach dem unter „Beispiele“, „Extraktionsprozeß der Stärke aus Kartoffeln“ beschriebenen Verfahren.

15

Fig 2:

Graphische Darstellung der Viskositätseigenschaften von Stärke aus Kartoffelpflanzen.

- Die Analyse wurde mit einem Rapid Visco Analyser (Newport Scientific Pty Ltd., Investmet Support Group, Warriewood NSW 2102, Australien) durchgeführt. Die
- 20 Bedingungen, unter welchen die Analyse durchgeführt wurde, sind unter RVA-Analysemethode 2 im Abschnitt „Allgemeine Methoden“ beschrieben. Die untersuchte Stärke wurde aus Knollen von Wildtyp-Pflanzen (WT), Pflanzen mit einer reduzierten Aktivität eines SSIII-Proteins und eines BEI-Proteins (038VL008 und 038VL107) oder
- 25 aus Pflanzen, die eine reduzierte Aktivität eines SSIII-Proteins und eines BEI-Proteins und eines BEII-Proteins (110CF003 und 108CF041) aufweisen, isoliert. Die Isolierung der Stärke erfolgte nach dem unter „Beispiele“, „Extraktionsprozeß der Stärke aus Kartoffeln“ beschriebenen Verfahren.

Fig 3:

- 30 Graphische Darstellung der Viskositätseigenschaften von Stärke aus Kartoffelpflanzen. Die Analyse wurde mit einem Rapid Visco Analyser (Newport Scientific Pty Ltd., Investmet Support Group, Warriewood NSW 2102, Australien) durchgeführt. Die Bedingungen, unter welchen die Analyse durchgeführt wurde, sind unter RVA-



Analysemethode 3 im Abschnitt „Allgemeine Methoden“ beschrieben. Die untersuchte Stärke wurde aus Knollen von Wildtyp-Pflanzen (WT), Pflanzen mit einer reduzierten Aktivität eines SSIII-Proteins und eines BEI-Proteins (038VL008 und 038VL107) oder aus Pflanzen, die eine reduzierte Aktivität eines SSIII-Proteins und eines BEI-Proteins und eines BEII-Proteins (110CF003 und 108CF041) aufweisen, isoliert. Die Isolierung der Stärke erfolgte nach dem unter „Beispiele“, „Extraktionsprozeß der Stärke aus Kartoffeln“ beschriebenen Verfahren.

Fig 4:

- 10 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Kartoffelstärkekorns, welches aus Wildtyp-Pflanzen isoliert wurde.

Fig 5:

- 15 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Kartoffelstärkekorns, welches aus Pflanzen isoliert wurde, die eine verringerte Aktivität eines SSIII-Proteins und eines BEI-Proteins und eines BEII-Proteins aufweisen (110CF003).

Fig 6:

- 20 Schematische Darstellung des Vektors pGSV71- $\alpha$ -BEII-basta, welcher zur erneuten Transformation von Pflanzen, die bereits eine reduzierte Aktivität eines SSIII-Proteins und eines BEI-Proteins aufwiesen, benutzt wurde.  
(RB, linke T-DNA Border, LB, rechte T-DNA Border; CaMV35, 35S Promotor des Blumenkohl Mosaik Virus; NOS, Polyadenylierungssequenz des Nopalinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*; OCS, Polyadenylierungssequenz des Octopinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*; B33, Promotor des Patatin Gens aus Kartoffel;  
25 BEII, kodierende Sequenzen des BEII Gens aus Kartoffel; bar, Sequenz kodierend eine Phosphinothricinacetyltransferase aus *Streptomyces hygroscopicus*)

Fig 7:

- 30 Schematische Darstellung des Vektors pB33- $\alpha$ -BE- $\alpha$ -SSIII-Kan, welcher zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit reduzierter Aktivität eines SSIII-Proteins und eines BEI-Proteins benutzt wurde. (RB, linke T-DNA Border, LB, rechte T-DNA Border; nos5', Promotor des Nopalin Synthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*; nptII,

Gen kodierend die Aktivität einer Neomycinphosphotransferase; nos3'  
 Polyadenylierungssequenz des Nopalinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*;  
 OCS Polyadenylierungssequenz des Octopinsynthase Gens aus *Agrobacterium*  
*tumefaciens*; B33, Promotor des Patatin Gens aus Kartoffel; BE, kodierende Sequenzen  
 5 des BEI Gens aus Kartoffel; SSIII kodierende Sequenzen des SSIII Gens aus Kartoffel)

#### Fig 8

Die Abbildung zeigt das gesamte Elutionsdiagramm des Amylopektins von Stärken der  
 Linien 038VL008, 108CF041 und Wildtyp. Wie die Abbildung zeigt ist der Anteil an  
 10 größeren Seitenketten in der Linie 108CF041 deutlich höher im Gegensatz zum  
 Hintergrund 038VL008 und/oder dem entsprechenden Wildtyp.

#### Fig 9

Kalibrierkurve und Tabelle mit zugehörigen Dextran-Standards  
 15

#### Fig 10

Die Abbildung zeigt das gesamte Elutionsdiagramm des Amylopektins von Stärken der  
 Linien 038VL008, 108CF041 und Wildtyp. Im Unterschied zu Fig 8 ist auf der x-Achse  
 nicht das Elutionsvolumen, sondern das Molekulargewicht dargestellt. Mit Hilfe der  
 20 Kalibrierungsgeraden aus Fig 9 wurde das Elutionsdiagramm von Fig 8 in Abhängigkeit  
 von der Molekulargewichtsverteilung dargestellt.

#### Fig 11

Die Darstellung zeigt die Verteilung des Seitenkettenprofils des Amylopektins aus  
 25 Pflanzen der Linie 038VL008 im Vergleich zum Seitenkettenprofil von Amylopektin aus  
 Wildtyp-Pflanzen.

#### Fig 12

Die Darstellung zeigt die Verteilung des Seitenkettenprofils des Amylopektins aus  
 30 Pflanzen der Linie 108CF041 im Vergleich zum Seitenkettenprofil von Amylopektin aus  
 Wildtyp-Pflanzen.

### **Beschreibung der Sequenzen**

Seq ID 1:

Nukleinsäuresequenz der Stärkesynthase SSIII aus Kartoffel (*Solanum tuberosum*) mit

- 5 Angabe der Sequenzen, die für das entsprechende SSIII Protein kodieren.

Seq ID 2:

Aminosäuresequenz eines SSIII Proteins aus Kartoffel.

Seq ID 3:

Aminosäuresequenz der Pfam cbm25 Bindedomäne des SSIII-Proteins aus Kartoffel.

- 10 (*Solanum tuberosum*).

Seq ID 4:

Kodierende Nukleinsäuresequenz des Verzweigungsenzyms BEI aus Kartoffel

(*Solanum tuberosum*).

Seq ID 5:

- 15 Aminosäuresequenz des Verzweigungsenzyms BEI aus Kartoffel (*Solanum tuberosum*)

Seq ID 6:

Kodierende Nukleinsäuresequenz des Verzweigungsenzyms BEII aus Kartoffel

(*Solanum tuberosum*).

Seq ID 7:

- 20 Aminosäuresequenz des Verzweigungsenzyms BEII aus Kartoffel (*Solanum tuberosum*)

Seq ID 8:

Mittels PCR amplifizierte Nukleinsäuresequenz des Verzweigungsenzyms BEII aus  
Kartoffel (*Solanum tuberosum*)

## Allgemeine Methoden

In den Beispielen wurden die folgenden Methoden verwendet:

5

### Stärkeanalytik

#### a) Bestimmung des Amylosegehaltes bzw. des Amylose/Amylopektinverhältnisses

Stärke wurde nach Standardmethoden aus Kartoffelpflanzen isoliert, und der Amylosegehalt sowie das Verhältnis Amylose zu Amylopektin wurde nach der von Hovenkamp-Hermelink et al. beschriebenen Methode (Potato Research 31, (1988), 241-246) bestimmt.

#### b) Bestimmung des Phosphatgehaltes

In der Stärke können die Positionen C2, C3 und C6 der Glukoseeinheiten phosphoryliert sein. Zur Bestimmung des C6-P-Gehaltes der Stärke werden 50 mg Stärke in 500 µl 0,7 M HCl 4 h bei 95°C hydrolysiert. Anschließend werden die Ansätze für 10 min bei 15500 g zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Von den Überständen werden 7 µl mit 193 µl Imidazol-Puffer (100 mM Imidazol, pH 7,4; 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA und 0,4 mM NAD) gemischt. Die Messung wurde im Photometer bei 340 nm durchgeführt. Nach der Etablierung einer Basisabsorption wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von 2 Einheiten (units) Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (von Leuconostoc mesenteroides, Boehringer Mannheim) gestartet. Die Absorptionsänderung ist direkt proportional zur Konzentration des G-6-P Gehaltes der Stärke.

25

Die Bestimmung des Gesamtposphatgehaltes erfolgte nach der Methode von Ames (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118).

30

Es werden ca. 50 mg Stärke mit 30 µl ethanolischer Magnesiumnitrat-Lösung versetzt und drei Stunden bei 500°C im Muffelofen verascht. Der Rückstand wird mit 300 µl 0,5 M Salzsäure versetzt und 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wird ein Aliquot auf 300 µl 0,5 M Salzsäure aufgefüllt, zu einer Mischung aus 100 µl 10%iger Ascorbinsäure und 600 µl 0,42% Ammoniummolybdat in 2 M Schwefelsäure gegeben und 20 min bei 45°C inkubiert.

Es folgt eine photometrische Bestimmung bei 820nm unter Berücksichtigung einer Phosphat-Eichreihe als Standard.

5 c) Bestimmung der Gelfestigkeit (Texture Analyser)

1,5 g Stärke (TS) werden in 25 ml einer wäßrigen Suspension im RVA-Gerät verkleistert (Temperaturprogramm: s. Punkt d) „Bestimmung der Viskositätseigenschaften mittels eines Rapid Visco Analyzers (RVA)“) und anschließend für 24 h bei Raumtemperatur in einem geschlossenen Gefäß gelagert.

10 Die Proben werden unter der Sonde (zylindrischer Stempel mit planer Oberfläche) eines Texture Analysers TA-XT2 der Firma Stable Micro Systems (Surrey, UK) fixiert und die Gelfestigkeit mit folgenden Parametern bestimmt:

- |    |   |                      |                     |
|----|---|----------------------|---------------------|
|    | - | Test-Geschwindigkeit | 0,5 mm/s            |
|    | - | Eindringtiefe        | 7 mm                |
| 15 | - | Kontaktfläche        | 113 mm <sup>2</sup> |
|    | - | Druck                | 2 g                 |

20 d) Bestimmung der Viskositätseigenschaften mittels eines Rapid Visco Analyzers (RVA)

Standardmethode

2 g Stärke (TS) werden in 25 ml H<sub>2</sub>O (VE Wasser, Leitfähigkeit von mindestens 15 mega Ohm) aufgenommen und für die Analyse in einem Rapid Visco Analyser (Newport Scientific Pty Ltd., Investmet Support Group, Warriewood NSW 2102, Australien) verwendet. Der Betrieb des Gerätes erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Dabei erfolgt die Angabe der Viskositätswerte in RVUs gemäß der Betriebsanleitung des Herstellers, die hiermit insoweit durch Bezugnahme in die Beschreibung aufgenommen wird. Zur Bestimmung der Viskosität der wäßrigen Lösung der Stärke wird die Stärkesuspension zunächst für eine Minute auf 50°C erhitzt (Schritt 1), danach von 50°C auf 95°C mit einer Geschwindigkeit von 12°C pro Minute (Schritt 2) erhitzt. Anschließend wird die Temperatur für 2.5 Min bei 95°C gehalten (Schritt 3). Danach wird die Lösung von 95°C auf 50°C abgekühlt, mit einer Geschwindigkeit von 12°C pro Minute (Schritt 4). Während der gesamten Dauer wird die Viskosität bestimmt.

Insbesondere in den Fällen, wo bei der Einwage von 2,0 g (TS) Stärke in 25 ml H<sub>2</sub>O (VE Wasser, Leitfähigkeit von mindestens 15 mega Ohm) die Grenzen des Meßbereichs des RVA nicht ausreichen, wurden nur 1,5g Stärke (TS) in 25 ml H<sub>2</sub>O (VE Wasser, Leitfähigkeit von mindestens 15 mega Ohm) aufgenommen.

5

Um eine Vergleichbarkeit mit dem Stand der Technik herzustellen wurde zudem in einigen Fällen ein geändertes Temperaturprofil benutzt.

Folgende Temperaturprofile wurden verwendet:

#### 10 - RVA-Analysemethode 1:

Zur Bestimmung der Viskosität einer 6%igen wässrigen Lösung der Stärke wird die Stärkesuspension zunächst für 10 Sekunden mit 960 rpm gerührt, um anschließend bei einer Rührgeschwindigkeit von 160 rpm für zunächst eine Minute auf 50 °C erhitzt zu werden (Schritt 1). Danach folgt eine Erhöhung der Temperatur von 50 °C auf 95 °C mit einer Heizgeschwindigkeit von 12°C pro Minute (Schritt 2). Die Temperatur wird für 2.5 Minuten bei 95 °C gehalten (Schritt 3) und danach mit 12 °C pro Minute von 95 °C auf 50 °C gekühlt (Schritt 4). Der letzte Schritt (Schritt 5) hält die Temperatur von 50°C für 2 Minuten.

Nach Beendigung des Programms wird der Rührer entfernt und der Becher abgedeckt.

20 Die verkleisterte Stärke steht nun für die Texturanalyse nach 24 h zur Verfügung.

#### RVA- Analysemethode 2:

Zur Bestimmung der Viskosität einer 6%igen wässrigen Lösung der Stärke wird die Stärkesuspension zunächst für 10 Sekunden mit 960 rpm gerührt, um anschließend bei einer Rührgeschwindigkeit von 160 rpm für zunächst zwei Minuten auf 50 °C erhitzt zu werden (Schritt 1). Danach erfolgt eine Erhöhung der Temperatur von 50 °C auf 95 °C mit einer Heizgeschwindigkeit von 1,5 °C pro Minute (Schritt 2). Die Temperatur wird für 15 Minuten bei 95 °C gehalten (Schritt 3) und danach mit 1.5 °C pro Minute von 95 °C auf 50 °C gekühlt (Schritt 4). Der letzte Schritt (Schritt 5) hält die Temperatur von 50°C für 15 Minuten.

30

Nach Beendigung des Programms wird der Rührer entfernt und der Becher abgedeckt. Die verkleisterte Stärke steht nun für die Texturanalyse nach 24 h zur Verfügung.

### RVA Analysemethode 3:

Zur Bestimmung der Viskosität einer 10%igen wässrigen Lösung der Stärke wird die Stärkesuspension zunächst für 10 Sekunden mit 960 rpm gerührt, um anschließend bei einer Rührgeschwindigkeit von 160 rpm für zunächst zwei Minuten auf 50 °C erhitzt zu werden (Schritt 1). Danach folgt eine Erhöhung der Temperatur von 50 °C auf 95 °C mit einer Heizgeschwindigkeit von 1,5 °C pro Minute (Schritt 2). Die Temperatur wird für 15 Minuten bei 95 °C gehalten (Schritt 3) und danach mit 1,5 °C pro Minute von 95 °C auf 50 °C gekühlt (Schritt 4). Der letzte Schritt (Schritt 5) hält die Temperatur von 50 °C für 15 Minuten. Dieses Profil der RVA Analyse entspricht desjenigen, welches in WO 96 34968 angewendet wurde.

Nach Beendigung des Programms wird der Rührer entfernt und der Becher abgedeckt. Die verkleisterte Stärke steht nun für die Texturanalyse nach 24 h zur Verfügung.

Im Profil der RVA Analyse gibt es charakteristische Werte, die zum Vergleich unterschiedlicher Messungen und Substanzen dargestellt werden. Die folgenden Begriffe sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wie folgt verstanden werden:

#### 1. Maximale Viskosität (RVA Max)

Unter der maximalen Viskosität versteht man den höchsten Viskositätswert, gemessen in RVUs, der in Schritt 2 oder 3 des Temperaturprofils erreicht wird.

#### 2. Minimale Viskosität (RVA Min)

Unter der minimalen Viskosität versteht man den geringsten Viskositätswert, gemessen in RVUs, der nach der Maximalen Viskosität im Temperaturprofil auftritt. Normalerweise erfolgt dieses in Schritt 3 des Temperaturprofils.

#### 3. Finale Viskosität (RVA Fin)

Unter der Finalen Viskosität versteht man den Viskositätswert, gemessen in RVUs, der am Ende der Messung auftritt.

#### 4. Setback (RVA Set)

Der sogenannte "Setback" wird berechnet, indem man den Wert der Finalen Viskosität von der desjenigen Minimums, welches im Kurvenverlauf nach Erreichen der Maximalen Viskosität auftritt, subtrahiert.

#### 5. Verkleisterungstemperatur (RVA T)

Unter der Verkleisterungstemperatur versteht man die Zeit im Temperaturprofil, zu welcher die Viskosität zuerst stark für eine kurze Periode ansteigt.

e) Analyse der Seitenkettenverteilung des Amylopektins mittels Ionenaustauschchromatographie

Zur Trennung von Amylose und Amylopektin werden 200mg Stärke in 50ml Reaktionsgefäßen mit 12ml 90% (v/v) DMSO in H<sub>2</sub>O gelöst. Nach Zugabe von 3 Volumen Ethanol wird das Präzipitat durch 10 minütige Zentrifugation bei etwa 1800g bei Raumtemperatur (RT) abgetrennt. Das Pellet wird dann mit 30ml Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40ml 1% (w/v) NaCl Lösung bei 75°C gelöst. Nach Abkühlung der Lösung auf 30°C werden langsam etwa 90mg Thymol zugegeben und diese Lösung für mindestens 60h bei 30°C inkubiert. Anschließend wird die Lösung für 30 min bei 2000g (RT) zentrifugiert. Der Überstand wird dann mit 3 Volumen Ethanol versetzt und das ausfallende Amylopektin mittels 5 minütiger Zentrifugation bei 2000g (RT) abgetrennt. Das Pellet (Amylopektin) wird dann mit Ethanol gewaschen und mittels Aceton getrocknet. Durch Zugabe von DMSO zum Pellet wird eine 1% Lösung hergestellt von der 200µl mit 345µl Wasser, 10µl 0.5M Natriumacetat (pH3.5) und 5µl Isoamylase (1:10 verdünnt; Megazyme) versetzt und bei 37°C für etwa 16h inkubiert werden. Eine wässrige 1:5 Verdünnung dieses Verdaus wird anschließend mit einem 0.2µm Filter filtriert und 100µl des Filtrats ionenchromatografisch analysiert (HPAEC-PAD, Dionex). Die Separation erfolgte mit einer PA-100 Säule (mit entsprechender Vorsäule), die Detektion amperometrisch. Die Elutionsbedingungen waren wie folgt:

Lösung A - 0.15M NaOH

Lösung B – 1 M Natriumacetat in 0.15M NaOH



t (min)	Lösung A (%)	Lösung B (%)
5	0	100
35	30	70
45	32	68
60	100	0
70	100	0
72	0	100
80	0	100
stop		

**Tabelle 1:** Zusammensetzung des Elutionspuffers für die Seitenkettenanalyse des Amylopektins zu verschiedene Zeiten während der HPEAC-PAD Dionex Analyse. Zwischen den angegebenen Zeitpunkten verändert der Elutionspuffer seine Zusammensetzung jeweils einem linearen Verlauf folgend.

5

Die Bestimmung des relativen Anteils an kurzen Seitenketten am Gesamtanteil aller Seitenketten erfolgt über die Bestimmung des prozentualen Anteils einer bestimmten Seitenkette am Gesamtanteil aller Seitenketten. Der Gesamtanteil aller Seitenketten wird ermittelt über die Bestimmung der Gesamtfläche unter den Peaks, die im HPCL-Chromatogramm die Polymerisationsgrade von DP6 bis 26 repräsentieren.

10

Der prozentuale Anteil einer bestimmten Seitenkette am Gesamtanteil aller Seitenketten wird ermittelt über die Bestimmung des Verhältnisses der Fläche unter dem Peak, der diese Seitenkette im HPLC-Chromatogramm repräsentiert, zur Gesamtfläche. Zur Bestimmung der Peakflächen wurde das Programm Chromelion 6.20 Version 6.20 der Firma Dionex, USA, verwendet werden.

15

#### f) Korngrößenbestimmung

Stärke wurde nach Standardmethoden aus Kartoffelknollen extrahiert (siehe Beispiele).

20

Die Korngrößenbestimmung wurde dann mit einem Fotosedimentometer des Typs "Lumosed FS1" der Firma Retsch GmbH, Deutschland unter Verwendung der Software V.2.3 durchgeführt. Die Softwareeinstellungen wurden wie folgt festgelegt:

Stoff-Daten:

Kalibration Nr. 0

25

Dichte [kg/m<sup>3</sup>] 1500

Sedimentationsflüssigkeit:

Typ Wasser

Viskosität [Pa s]	0.001
Dichte [kg/m <sup>3</sup> ]	1000
Zusatz	-
Mess-Daten	5 min
Siebschnitt [µm]	250
Durchgang [%]	100
Messbereich	4.34 – 117.39 µm
Eichung	N
Temperatur	20°C

5

-10 Die Körngrößenverteilung wurde in wäßriger Lösung bestimmt und erfolgte nach Herstellerangaben sowie basierend auf der Literatur von z.B. H. Pitsch, Korngrößenbestimmung; LABO-1988/3 Fachzeitschrift für Labortechnik, Darmstadt.

g) Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM)

15 Für die Untersuchung der Oberfläche der Stärkeproben wurden diese auf Probenträger mit leitfähigem Kleber aufgestäubt. Zur Vermeidung von Aufladung wurden die Probenträger abschließend mit einer 4 nm Pt-Schicht besputtet. Die Untersuchungen der Stärkeproben wurden mit dem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop JSM 6330 F (Jeol) bei einer

20 Beschleunigungsspannung von 5 kV durchgeführt.

h) Bestimmung der Aktivität der SSIII, BEI- und BEII-Proteine

Die Bestimmungen erfolgten wie in den Beispielen angegeben.

25

## Beispiele

### Herstellung des Expressionsvektors ME5/6

- pGSV71 ist ein Derivat des Plasmides pGSV7, welches sich vom intermediären Vektor pGSV1 ableitet. pGSV1 stellt ein Derivat von pGSC1700 dar, dessen Konstruktion von Cornelissen und Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989), 19-25) beschrieben wurde. pGSV1 wurde aus pGSC1700 erhalten, durch Deletion des Carbenicillin Resistenzgen, sowie Deletion der T-DNA-Sequenzen der TL-DNA-Region des Plasmides pTiB6S3.
- 10 pGSV7 enthält den Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (Bolivar et al., Gene 2, (1977), 95-113) sowie den Replikationsursprung des *Pseudomonas*-Plasmides pVS1 (Itoh et al., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 enthält außerdem das selektierbare Markergen *aadA*, aus dem Transposon Tn1331 aus *Klebsiella pneumoniae*, welches Resistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin verleiht.
- 15 (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky and Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40)
- Das Plasmid pGSV71 wurde erhalten durch Klonierung eines chimären *bar*-Gens zwischen die Borderregionen von pGSV7. Das chimäre *bar*-Gen enthält die Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus zur Initiation der Transkription (Odell et al., Nature 313, (1985), 180), das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., Embo J. 6, (1987), 2519-2523) und den 3'-untranslatierten Bereich des Nopalinsynthasegens der T-DNA von pTiT37, zur Termination der Transkription und Polyadenylierung. Das *bar*-Gen vermittelt Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium.
- 20
- 25 Die T-DNA enthält an Position 198-222 die rechte Randsequenz der TL-DNA aus dem Plasmid pTiB6S3 (Gielen et al., EMBO J. 3, (1984), 835-846). Zwischen Nukleotid 223-249 befindet sich eine Polylinker-Sequenz. Die Nukleotide 250-1634 enthalten die P35S3 Promotor-Region des Blumenkohl-Mosaik-Virus (Odell et al., siehe oben). Die codierende Sequenz des Phosphinothricin-Resistenzgen (*bar*) aus *Streptomyces*
- 30 *hygroscopicus* (Thompson et al. 1987, siehe oben) ist zwischen den Nukleotiden 1635-2186 enthalten. Dabei wurden die zwei endständigen Codons am 5'-Ende des *bar*-Wildtyp-Gens ersetzt durch die Codons ATG und GAC. Zwischen den Nukleotiden 2187-2205 befindet sich eine Polylinker-Sequenz. Das 260 bp lange *TaqI*-Fragment des

nicht-translatierten 3'-Endes des Nopalinsynthase-Gens (3'nos) aus der T-DNA des Plasmides pTiT37 (Depicker et al., J. Mol. Appl. Genet. 1, (1982), 561-573) befindet sich zwischen den Nukleotiden 2206 und 2465. Die Nukleotide 2466-2519 enthalten eine Polylinker-Sequenz. Die linke Randsequenz der TL-DNA aus pTiB6S3 (Gielen et al., EMBO J. 3, (1984), 835-846) befindet sich zwischen den Nukleotiden 2520-2544.

Der Vektor pGSV71 wurde dann mit dem Enzym *Pst*I aufgeschnitten und geglättet. Aus dem Vektor pB33-Kan wurde der B33 Promotor sowie die *ocs*-Kassette als *Eco*RI-*Hind*III-Fragment ausgeschnitten und geglättet und in den mit *Pst*I aufgeschnittenen und geglätteten Vektor pGSV71 eingefügt. Der erhaltene Vektor diente als Ausgangsvektor zur Konstruktion von ME5/6: In die zwischen B33-Promotor und *ocs*-Element gelegene *Pst*I-Schnittstelle des Vektors ME4/6 wurde ein Oligonukleotid, enthaltend die Schnittstellen *Eco*RI, *Pac*I, *Spe*I, *Srf*I, *Spe*I, *Not*I, *Pac*I und *Eco*RI, unter Verdopplung der *Pst*I-Schnittstelle eingeführt. Der erhaltene Expressionsvektor wurde als ME5/6 bezeichnet.

#### Beschreibung des Vektors pSK-Pac:

pSK-Pac ist ein Derivat des pSK-Bluescript (Stratagene, USA) bei dem flankierend zur multiplen Klonierungsstelle (MCS) je eine *Pac*I Schnittstelle eingeführt wurde.

#### **Herstellung transgener Kartoffelpflanzen, die eine verringerte Genexpression eines BEI-, SSIII-, und eines BEII-Gens aufweisen**

Zur Erzeugung transgener Pflanzen, die eine verringerte Aktivität eines BEI, eines SSIII und eines BEII Proteins aufweisen, wurden zunächst transgene Pflanzen erzeugt, die eine verringerte Aktivität eines BEI und eines SSIII Proteins aufweisen. Zu diesem Zwecke wurde die T-DNA des Plasmids pB33- $\alpha$ BEI- $\alpha$ SSIII-Kan mit Hilfe von Agrobakterien, wie bei Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8, (1989), 23-29) beschrieben, in Kartoffelpflanzen transferiert.

Zur Konstruktion des Plasmids pB33- $\alpha$ BEI- $\alpha$ SSIII-Kan (siehe Fig 7) wurde zunächst der Expressionsvektor pBin33-Kan konstruiert. Dazu wurde der Promotor des Patatin Gens B33 aus *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al., 1989, siehe oben) als *Dra*I-Fragment (Nukleotide -1512 - +14) in den mit *Sst*I geschnittenen Vektor pUC19 (Genbank Acc. No. M77789), dessen Enden mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase geglättet worden waren,

ligiert. Daraus entstand das Plasmid pUC19-B33. Aus diesem Plasmid wurde der B33-Promotor mit *EcoRI* und *SmaI* herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pBinAR ligiert. Hieraus entstand der pflanzliche Expressionsvektor pBin33-Kan. Das Plasmid pBinAR ist ein Derivat des Vektorplasmids pBin19 (Bevan, Nucl. Acid Research 12, (1984), 8711-8721) und wurde von Höfgen and Willmitzer (Plant Sci. 66, (1990), 221-230) konstruiert. Anschließend wurde ein 1631 Bp langes HindII-Fragment, welches eine partielle cDNA codierend für das BEI-Enzym aus Kartoffel enthält (Kossmann et al., 1991, Mol. & Gen. Genetics 230(1-2):39-44), geglättet und in "antisense"-Orientierung bezüglich des B33 Promotors (Promotor des Patatin Gens B33 aus *Solanum tuberosum*; Rocha-Sosa et al., 1989) in den mit *SmaI* vorgeschnittenen Vektor pBinB33 eingeführt. Das erhaltene Plasmid wurde mit *BamHI* aufgeschnitten. In die Schnittstelle wurde ein 1363 Bp langes *BamHI*-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA codierend für das SS III-Enzym aus Kartoffel (Abel et al., 1996, loc.cit.), ebenfalls in "antisense"-Orientierung bezüglich des B33-Promotors eingeführt.

Nach der Transformation konnten verschiedene Linien transgener Kartoffelpflanzen identifiziert werden, deren Knollen einen deutlich verringerte Aktivität eines BEI und SSIII-Proteins aufwiesen. Die aus dieser Transformation resultierenden Pflanzen wurden mit 038VL bezeichnet.

Zum Nachweis der Aktivität löslicher Stärkesynthasen (SSIII) durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese wurden Gewebeproben von Kartoffelknollen in 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 2 mM DTT, 2,5 mM EDTA, 10 % Glycerin und 0,4 mM PMSF aufgeschlossen. Die Elektrophorese wurde in einer MiniProtean II Kammer (BioRAD) durchgeführt. Die Monomerkonzentration der 1,5 mm dicken Gele war 7,5 % (w/v), als Gel- und Laufpuffer diente 25 mM Tris-Glycin pH 8,4. Gleiche Mengen an Proteinextrakt wurden aufgetragen und für 2 h bei 10 mA je Gel aufgetrennt.

Anschließend erfolgte die Inkubation der Aktivitäts-Gele in 50 mM Tricine-NaOH pH 8,5, 25 mM Kaliumacetat, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM ADP-Glukose, 0,1 % (w/v) Amylopektin und 0,5 M Natriumcitrat. Gebildete Glukane wurden mit Lugolscher Lösung angefärbt.

Der Nachweis der BEI Aktivität erfolgte ebenfalls mit Hilfe der nicht denaturierenden Gelelektrophorese:

Zur Isolierung von Proteinen aus Pflanzen wurde das Probenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörstert, in Extraktionspuffer (50 mM Na-Citrat, pH 6.5; 1 mM EDTA, 4 mM DTT) aufgenommen und nach Zentrifugation (10 min, 14.000 g, 4 °C) direkt zur Messung der Proteinkonzentration nach Bradford eingesetzt. Anschließend wurde je nach Bedarf 5 bis 20 µg Gesamt-Proteinextrakt mit 4-fach Loading-Buffer (20% Glycerin, 125 mM Tris HCl, pH 6,8) versetzt und auf ein „BE-Aktivitätsgel“ geladen. Der Laufpuffer (RB) setzte sich wie folgt zusammen: RB = 30,2 g Tris-Base, pH 8.0, 144 g Glycine auf 1 L H<sub>2</sub>O.

Nach Beendigung des Gellaufes wurden die Gele in je 25 ml „Phosphorylase-Puffer“ (25 ml 1M Na-Citrat pH 7,0; 0,47 g Glucose-1-Phosphat, 12,5 mg AMP, 2,5mg Phosphorylase a/b aus „rabbit“) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Färbung der Gele wurde mit Lugol'scher Lösung durchgeführt.

Weitergehende Analysen zeigten, dass isolierte Stärken der Linie 038VL008 und 038VL107, welche eine Reduzierung sowohl des BEI-, als auch des SSIII-Proteins aufweisen, den höchsten Phosphatgehalt aller untersuchten unabhängigen Transformanten aufwiesen.

Pflanzen dieser Linien wurden anschließend wie beschrieben bei Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8, (1989), 23-29) mit dem Plasmid pGSV71-αBEII-basta transformiert.

Plasmid pGSV71-αBEII-basta wurde konstruiert, indem eine knollenspezifische Kartoffel cDNA Bank mit einem durch RT-PCR (Primer: 5'- ggggggtgttgctttgacta und 5'- cccttctcctcctaattccca; Stratagene ProSTAR™ HF Single-Tube RT-PCR System) mit Gesamt-RNA aus Knollen als Vorlage amplifizierten DNA Fragment nach Standardmethoden durchmustert wurde. Auf diese Weise wurde ein etwa 1250 bp großes DNA Fragment isoliert (SEQ ID No. 8), welches dann als EcoRV-SmaI Fragment in die EcoRV Schnittstelle des Klonierungsvektor pSK-Pac (siehe oben) subkloniert und abschließend als PacI Fragment in antisense Orientierung, bezogen auf den Promotor, in den Expressionsvektor ME5/6 ligiert wurde. Somit entstand Plasmid pGSV71-αBEII-basta (siehe Fig 6).

Von den durch Transformation mit dem Plasmid pGSV71-αBEII-basta erhaltenen Pflanzen, die als 108CF bzw. 110CF bezeichnet wurden, wurden Gewebeproben von Knollen der unabhängigen Transformanten genommen und deren Amylosegehalt

ermittelt (siehe Methoden). Die Stärken der unabhängigen Linien, deren Knollen den höchsten Amylosegehalt aufwiesen, wurden für eine weitere Analyse der Stärkeeigenschaften herangezogen. Zum Nachweis, dass diese Pflanzen zusätzlich zu einer reduzierten Aktivität eines BEI- und SSIII-Protein auch eine reduzierte Aktivität eines BEII-Proteins aufweisen, wurde ebenfalls eine Analyse mit Hilfe der nicht denaturierenden Gelelektrophorese durchgeführt. Die Analyse wurde mit der gleichen Methode wie oben bereits für die Analyse der reduzierten BEI-Aktivität durchgeführt, außer, dass das nicht denaturierende Polyacrylamidgel zusätzlich zur oben beschriebenen Zusammensetzung 0,5% Maltodextrin (Beba, Maltodextrin-Lösung 15%ig für Neugeborene, Nestle) enthielt. Durch Zusatz des Dextrins konnten die unterschiedlichen Aktivitäten der BEI- und BEII-Proteine nach Inkubation der Gele in „Phosphorylase-Puffer“ (25 ml 1M Na-Citrat pH 7,0, 0,47 g Glucose-1-Phosphat, 12,5 mg AMP, 2,5mg Phosphorylase a/b aus „rabbit“) über Nacht bei 37 °C und anschließender Färbung mit Lugol'scher Lösung in einem Gel dargestellt werden.

15

#### ***Extraktionsprozess der Stärke aus Kartoffeln***

Alle Knollen einer Linie (4 bis 5 kg) werden gemeinsam in einem handelsüblichen Entsafter (Multipress automatic MP80, Braun) aufgearbeitet. Das stärkehaltige Fruchtwasser wird in einem 10 L Eimer (Verhältnis Höhe des Eimers/Durchmesser des Eimers = ca. 1,1), in dem 200 ml Leitungswasser mit einer Löffelspitze (ca. 3-4 g) Natrium-Disulfit vorgelegt wurden, aufgefangen. Im Anschluss wird der Eimer mit Leitungswasser vollständig aufgefüllt. Nach einem 2 stündigen Absetzen der Stärke wird der Überstand abdekantiert, die Stärke erneut in 10 l Leitungswasser aufgeschwemmt und über ein Sieb mit 125 µm Maschenweite gegeben. Nach 2 Stunden (Stärke hat sich erneut am Boden des Eimers abgesetzt) wird erneut der wässrige Überstand dekantiert. Dieser Waschvorgang wird noch 3 mal wiederholt, so dass die Stärke insgesamt fünf mal in frischem Leitungswasser resuspendiert wird. Im Anschluss werden die Stärken bei 37 °C auf einen Wassergehalt von 12 – 17% getrocknet und im Mörser homogenisiert. Die Stärken stehen nun für Analysen zu Verfügung.

30

Beispiel 2**Analyse der Stärke von Pflanzen mit verringerter BEI-, SSIII- und BEII-Genexpression**

- 5 Die Stärke verschiedener unabhängiger Linien der in Beispiel 1 beschriebenen Transformationen 108CF und 110CF wurden aus Kartoffelknollen isoliert. Anschließend wurden die physico-chemischen Eigenschaften dieser Stärke analysiert. Die Ergebnisse der Charakterisierung der modifizierten Stärken sind in Tabelle 2 (Tab.2) für eine beispielhafte Auswahl bestimmter Pflanzenlinien dargestellt. Die Analysen wurden nach
- 10 - den oben beschriebenen Methoden durchgeführt.

Die folgende Tabellen 2, 3 und 4 fassen die Ergebnisse der RVA Analyse bezogen auf Stärke aus Wildtyp-Pflanzen zusammen:

**RVA-Analysemethode 1**

	RVA Max (%)	RVA Min (%)	RVA Fin (%)	RVA Set (%)	RVA T (%)	Gelfestigkeit
cv.Desiree	100	100	100	100	100	100
038VL008	158.7	69.8	72.0	79.5	73.0	55.4
108CF041	59.6	89.9	227.5	693.7	150.2	532.3
038VL107	151.1	94.3	94.0	93.0	82.2	52.2
110CF003	106.4	158.6	265.0	625.7	151.5	737.1

- 15 **Tabelle 2:** Angabe der charakteristischen Werte der RVA-Analyse von Stärke, isoliert aus Wildtyp-Pflanzen (cv. Desiree); Pflanzen mit einer verringerten Aktivität eines SSIII- und eines BEI-Proteins (038VL008, 038VL107), bzw. von Pflanzen mit einer verringerten Aktivität eines SSIII- und eines BEI- und eines BEII-Proteins (108CF041, 110CF003) in Prozent, bezogen auf Werte von Stärke des Wildtyps. Die RVA Analyse wurde nach Analysemethode 1 durchgeführt.

20

**RVA-Analysemethode 2**

	RVA Max (%)	RVA Min (%)	RVA Fin (%)	RVA Set (%)	RVA T (%)	Gelfestigkeit
cv. Desiree	100	100	100	100	100	100
038VL008	167.1	40.4	52.6	77.6	54.2	63.0
108CF041	44.5	82.5	187.5	402.7	137.4	412.2
038VL107	152.0	76.1	81.9	93.8	76.9	51.7
110CF003	92.4	172.2	n.d.	n.d.	139.0	795.0

- 25 **Tabelle 3:** Angabe der charakteristischen Werte der RVA-Analyse von Stärke, isoliert aus Wildtyp-Pflanzen (cv. Desiree), Pflanzen mit einer verringerten Aktivität eines SSIII- und eines BEI-Proteins (038VL008, 038VL107), bzw. von Pflanzen mit einer verringerten Aktivität eines SSIII- und eines BEI- und eines BEII- (108CF041, 110CF003) in Prozent, bezogen auf Werte von Stärke des Wildtyps. Die RVA Analyse wurde nach Analysemethode 2 durchgeführt.



## RVA-Analysemethode 3.

	RVA Max (%)	RVA Min (%)	RVA Fin (%)	RVA Set (%)	RVA T (%)	Gelfestigkeit
cv. Desiree	100	100	100	100	100	100
038VL008	n.d.	50.2	76.5	127.8	77.0	100.5
108CF041	74.7	291.0	n.d.	205.7	236.0	630.3
038VL107	n.d.	84.5	86.4	90.1	102.3	58.1
110CF003	89.8	259.7	n.d.	n.d.	196.6	663.9

5 **Tabelle 4:** Angabe der charakteristischen Werte der RVA-Analyse von Stärke, isoliert aus Wildtyp-Pflanzen (cv. Desiree), Pflanzen mit einer verringerten Aktivität eines SSIII- und eines BEI-Proteins (038VL008, 038VL107), bzw. von Pflanzen mit einer verringerten Aktivität eines SSIII- und eines BEI- und eines BEII-Proteins (108CF041, 110CF003) in Prozent, bezogen auf Werte von Stärke des Wildtyps. Die RVA Analyse wurde nach Analysemethode 3 durchgeführt.

Die folgende Tabellen 5,6 und 7 fassen die Ergebnisse der RVA Analyse zusammen.  
Die Werte beziehen sich nicht auf den Wildtyp, sondern sind die gemessenen Werte:

10

## RVA-Analysemethode 1 (siehe auch Fig 1)

	RVA Max (RVU)	RVA Min (RVU)	RVA Fin (RVU)	RVA Set (RVU)	RVA T (RVU)	Gelfestigkeit
cv. Desiree	255.05	162.33	210.25	47.92	4.6	25.1
038VL008	404.83	113.25	151.33	38.08	3.36	13.9
108CF041	152.08	145.92	478.33	332.42	6.91	133.6
038VL107	385.5	153	197.58	44.58	3.78	13.1
110CF003	271.5	257.42	557.25	299.83	6.97	185

15 **Tabelle 5:** Angabe der charakteristischen Werte der RVA-Analyse von Stärke, isoliert aus Wildtyp-Pflanzen (cv. Desiree), Pflanzen mit einer verringerten Aktivität eines SSIII- und eines BEI-Proteins (038VL008, 038VL107), bzw. von Pflanzen mit einer verringerten Aktivität eines SSIII- und eines BEI- und eines BEII-Proteins (108CF041, 110CF003) in RVUs. Die RVA Analyse wurde nach Analysemethode 1 durchgeführt.

## RVA-Analysemethode 2 (siehe auch Fig 2)

	RVA Max (RVU)	RVA Min (RVU)	RVA Fin (RVU)	RVA Set (RVU)	RVA T (RVU)	Gelfestigkeit
cv. Desiree	212.17	113.75	169.25	55.5	28.78	23.8
038VL008	354.58	45.92	89	43.08	15.61	15
108CF041	94.33	93.83	317.33	223.5	39.53	98.1
038VL107	322.58	86.58	138.67	52.08	22.13	12.3
110CF003	196.08	195.92	n.d.	n.d.	39.99	189.2

20 **Tabelle 6:** Angabe der charakteristische Werte der RVA-Analyse von Stärke, isoliert aus Wildtyp-Pflanzen (cv. Desiree), Pflanzen mit einer verringerten Aktivität eines SSIII- und eines BEI-Proteins (038VL008, 038VL107), bzw. von Pflanzen mit einer verringerten Aktivität eines SSIII- und eines BEI- und eines BEII-Proteins (108CF041, 110CF003) in RVUs. Die RVA Analyse wurde nach Analysemethode 2 durchgeführt.

25

## RVA-Analysemethode 3 (siehe auch Fig 3)

	RVA Max (RVU)	RVA Min (RVU)	RVA Fin (RVU)	RVA Set (RVU)	RVA T (RVU)	Gelfestigkeit
Desiree	819.67	207.67	314.25	106.58	16.88	56.5
038VL008	n.d.	104.17	240.33	136.17	12.99	56.8
108CF041	612.33	604.25	823.5	219.25	39.83	356.1
038VL107	n.d.	175.42	271.5	96.08	17.27	32.8
110CF003	736.08	539.42	n.d.	n.d.	33.18	375.1

Tabelle 7: Angabe der charakteristische Werte der RVA-Analyse von Stärke, isoliert aus Wildtyp-Pflanzen (cv. Desiree), Pflanzen mit einer verringerten Aktivität eines SSIII- und eines BEI-Proteins (038VL008, 038VL107), bzw. von Pflanzen mit einer verringerten Aktivität eines SSIII-Proteins und eines BEI-Proteins (108CF041, 110CF003) in RVUs. Die RVA Analyse wurde nach Analysemethode 3 durchgeführt.

10

## Zusammenfassung der Phosphat- und Amylosebestimmungen:

Nr.	Genotyp	Phosphat in C6 (%)	Gesamt Phosphat (%)	Amylose (%)	Amylose (% WT)
1	cv. Desiree	100	100	22	100
2	038VL008	346,4	255,2	19,4	85,8
3	108CF041	557,3	427,6	36,8	162,8
4	038VL107	225,5	182,8	19,7	87,2
5	110CF003	446,4	348,3	34,6	153,1

Tabelle 8: Phosphat- und Amylosegehalte von Stärke, isoliert aus Wildtyp-Pflanzen (cv. Desiree), Pflanzen mit einer verringerten Aktivität eines SSIII- und eines BEI-Proteins (038VL008, 038VL107), bzw. von Pflanzen mit einer verringerten Aktivität eines SSIII- und eines BEI- und eines BEII-Proteins (108CF041, 110CF003). Phosphatgehalte in C6-Position der Glukosemonomere und der Gesamtphosphatgehalt der Stärke sind in Prozent, bezogen auf Stärke aus Wildtyp-Pflanzen angegeben. Amylosegehalte sind in Prozent Amylose bezogen auf die Gesamtmenge der Stärke, bzw. in Prozent, bezogen auf den Amylosegehalt von Stärke aus Wildtyp-Pflanzen (%WT) angegeben.

20

Die Analyse der Seitenkettenverteilung des Amylopektins wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die folgende Tabelle enthält eine Übersicht über die Anteile der einzelnen Peakflächen:

25

Gluc.- einheiten	cv. Desiree	038VL 008	108CF 041	038VL 107	110CF 003
DP 6	1,52	4,16	1,88	2,39	0,86
DP 7	1,4	1,4	0,63	1,42	0,59
DP 8	1,23	0,77	0,33	0,99	0,38
DP 9	2,05	1,42	0,74	1,79	0,75
DP 10	3,55	2,8	1,74	3,33	1,77
DP 11	5,16	4,41	2,92	4,96	3,46
DP 12	6,25	5,77	4,47	6,22	5,17
DP 13	6,71	6,7	5,63	6,87	6,35
DP 14	6,75	7,06	6,35	6,99	7,38
DP 15	6,48	6,76	6,62	6,65	7,63
DP 16	6,07	5,99	6,34	6,11	7,13
DP 17	5,6	5,21	5,81	5,49	6,3
DP 18	5,28	4,78	5,87	5,11	5,98
DP 19	4,99	4,74	6,17	4,94	5,91
DP 20	4,76	4,65	6,07	4,78	5,64
DP 21	4,5	4,46	5,65	4,5	5,26
DP 22	4,16	4,12	5,07	4,2	4,7
DP 23	3,77	3,68	4,59	3,78	4,19
DP 24	3,44	3,36	4,24	3,42	3,75
DP 25	3,08	3,09	3,86	3,07	3,49
DP 26	2,73	2,8	3,36	2,77	3,03
DP 27	2,39	2,58	2,95	2,37	2,65
DP 28	2,07	2,26	2,39	2,01	2,1
DP 29	1,67	1,87	1,87	1,71	1,69
DP 30	1,38	1,58	1,54	1,35	1,3
DP 31	1,07	1,28	1,02	1,04	0,87
DP 32	0,79	0,96	0,7	0,75	0,6
DP 33	0,57	0,69	0,6	0,51	0,51
DP 34	0,36	0,43	0,39	0,32	0,34
DP 35	0,22	0,22	0,19	0,17	0,2
Total	100	100	99,99	100,01	99,98

**Tabelle 9:** Die Tabelle enthält eine Übersicht über die Anteile der einzelnen Peakflächen des HPAEC-Chromatogramms an der Gesamtpeakfläche von Wildtyp-Pflanzen (cv. Desiree), von 038VL008- und 038VL107-Pflanzen (Kartoffelpflanzen mit verminderter Aktivität eines BEI-Proteins und eines SSIII-Proteins) sowie von ausgewählten Linien der Transformationen 108CF bzw. 110CF (Kartoffelpflanzen mit einer verringerten Aktivität eines SSIII-Proteins und eines BEI-Proteins und eines BEII-Proteins). Die Anzahl der Glukosemonomere in den einzelnen Seitenketten ist als DP angegeben.

Die sogenannte „Peak Chain Length“, deren Wert sich aus der Bildung des Mittelwertes der beiden Kettenlängen (angegeben in DP) ergibt, die den größten Anteil an der Gesamtfläche unter den Peaks des HPAEC Chromatogramms ausmachen, liegt bei

entzweigtem Amylopektin von Wildtyp-Pflanzen bei DP= 13 bei 038VL-Pflanzen ebenfalls bei DP= 13 und bei den 108CF bzw. 110CF-Pflanzen im Durchschnitt bei 15.

- Setzt man die Peak Chain Length der transgenen Pflanzen ins Verhältnis zur Peak Chain Length von Amylopektin von Wildtyp-Pflanzen, so erhält man folgende Werte für das Peak Chain Length- Verhältnis (PCL-Verhältnis):

$$\text{PCL-Verhältnis für 038VL} = 13 / 13 = 1$$

$$\text{PCL-Verhältnis für 108/110CF} = 15 / 13 = 1,15$$

10 Darüberhinaus wurde die Morphologie der Stärkekörner durch Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht:

Die Oberfläche der Stärkekörner von 108/110CF-Pflanzen erscheint belegt oder aufgeraut mit Porenbildung.

- 15 Ferner wurde die Korngrößenbestimmung mit einem Fotosedimentometer des Typs "Lumosed" der Firma Retsch GmbH, Deutschland durchgeführt.  
Die mittlere Korngröße wurde von unbehandelten Stärke-Proben bestimmt. (Tab. 3).

mittlere Korngröße [ $\mu\text{m}$ ]

Probe	mittlere Korngröße
cv. Desiree	29,7
038VL008	21,5
108CF041	20,8
038VL107	22,9
110CF003	20,7

- 20 **Tabelle 10:** Werte der mittleren Korngröße von Stärke, isoliert aus Wildtyp-Pflanzen (cv. Desiree), Pflanzen mit einer verringerten Aktivität eines SSIII- und eines BEI-Proteins (038VL008, 038VL107), bzw. von Pflanzen mit einer verringerten Aktivität eines SSIII- und eines BEI- und eines BEII-Proteins (108CF041, 110CF003).

### Beispiel 3

25

**Analyse der Seitenkettenverteilung des Amylopektins mittels Gelpermeationschromatographie**

Zur Trennung von Amylose und Amylopektin werden 100 mg Stärke in 6 ml 90 % (v/v) DMSO unter ständigem Rühren gelöst. Nach Zugabe von 3 Volumen Ethanol wird das Präzipitat durch 10 minütige Zentrifugation bei 1800 g bei Raumtemperatur abgetrennt. Das Pellet wird anschließend mit 30 ml Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 ml 1 %iger (w/v) NaCl-Lösung bei 60 °C gelöst. Nach Abkühlung der Lösung auf 30 °C werden langsam etwa 50 mg Thymol zugegeben und diese Lösung für 2 bis 3 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wird die Lösung für 30 min bei 2000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird mit 3 Volumen Ethanol versetzt und das ausfallende Amylopektin mittels 5 minütiger Zentrifugation bei 2000 g bei Raumtemperatur abgetrennt. Das Pellet (Amylopektin) wird mit 10 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, 10 min bei 2000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und mittels Aceton getrocknet.

Anschließend werden 10 mg Amylopektin in 250 µl 90 % (v/v) DMSO für 10 Minuten bei 70 °C gerührt. Der Lösung werden 375 µl Wasser bei 80 °C zugegeben bis zum vollständiges Lösen.

Von dieser Lösung werden 200 µl mit 300 µl einer 16,6 mM Natriumacetat-Lösung pH 3,5 und 2 µl Isoamylase (0,24 u/µl, Megazyme, Sydney, Australien) versetzt und für 15 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Eine 1:4 Verdünnung dieses wässrigen Isoamylase Reaktionsgemisches mit DMSO, enthaltend 90 mM Na-Nitrat, wird anschließend mit einem 0.2 µm Filter filtriert und davon 24 µl des Filtrats chromatografisch analysiert. Die Separation erfolgte mit zwei Säulen, welche in Serie verbunden sind. Zuerst eine Gram PSS3000 (Polymer Standards Service, mit entsprechender Vorsäule) gefolgt von einer Gram PSS100. Die Detektion erfolgte mittels Refraktionsindex Detektor (RI 71, Shodex). Die Säule wurde äquilibriert mit DMSO enthaltend 90 mM Natriumnitrat. Eluiert wurde mit DMSO, enthaltend 90 mM Natriumnitrat mit einer Flußrate von 0,7 ml/min über einen Zeitraum von 1 Stunde.

Um das Elutionsvolumen mit der Molmasse zu korrelieren wurde die verwendete Säule mit Dextranstandards kalibriert. Die verwendeten Dextrane, ihre zugehörige Molmasse und die Elutionsvolumina sind in Fig 9 dargestellt. Mit der daraus resultierende Kalibrierungsgeraden wurde das Elutionsdiagramm als Molekulargewichtsverteilung dargestellt (Fig 10).

Zur weiteren Auswertung der erhaltenen Chromatogramme wurde das Programm Wingpc Version 6 der Firma Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Germany verwendet.

Die Gesamtfläche unterhalb der Linie des GPC Chromatogramms wurde in einzelne Abschnitte unterteilt, die jeweils Gruppen von Seitenketten unterschiedlicher Länge repräsentieren. Die gewählten Abschnitte enthielten dabei Glukanketten mit folgendem Polymerisierungsgrad (DP = Anzahl der Glukosemonomere innerhalb einer Seitenkette): DP $\leq$ 11, DP12-18, DP19-24, DP25-30, DP31-36, DP37-42, DP43-48, DP49-55, DP56-61 und DP62-123. Zur Festlegung des Molekulargewichts der einzelnen Seitenketten wurde für Glukose ein Molekulargewicht von 162 angenommen.

Die gesamte Fläche unterhalb der Linie im GPC Chromatogramm, wurde als 100% festgesetzt und der Anteil der Flächen der einzelnen Abschnitte bezogen auf den Anteil der Gesamtfläche berechnet. Aus dieser Analyse hervorgegangene Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargetellt.

15

	Wildtyp	08CF041 c
<b>DP<math>\geq</math>11</b>	100%	40%
<b>DP12-18</b>	100%	50%
<b>DP19-24</b>	100%	69%
<b>DP25-30</b>	100%	91%
<b>DP31-36</b>	100%	111%
<b>DP37-42</b>	100%	116%
<b>DP43-48</b>	100%	110%
<b>DP49-55</b>	100%	107%
<b>DP56-61</b>	100%	109%
<b>DP62-123</b>	100%	157%

20 Tabelle 11: Seitenkettenprofile DP 12 bis 18, DP 19 bis 24, DP 25 bis 30, DP31 bis 36, DP 37 bis 42, DP43-48, DP 49 bis 55, DP 56 bis 61 und DP62 bis 123 für Amylopektin, isoliert aus Wildtyp-Pflanzen (cv. Desiree), und aus Pflanzen mit einer verringerten Aktivität eines SSIII- und eines BEI- und eines BEII-Proteins (108CF041). Die Prozentangaben geben die Änderung der einzelnen Seitenkettenprofile bezogen auf Amylopektin, isoliert aus Wildtyp-Pflanzen an.

**Patentansprüche**

1. Pflanzenzelle, die genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden SSIII-Proteine und zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEI-Proteine und zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEII-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.
2. Pflanzenzelle nach Anspruch 1, wobei die genetische Modifikation in der Einführung eines oder mehrerer fremder Nukleinsäuremoleküle besteht, deren Vorhandensein und/oder Expression zur Verringerung der Aktivität von einem oder mehreren in der Pflanzenzelle vorkommenden SSIII- und BEI- und BEII-Proteinen führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.
3. Transgene Pflanzenzellen nach Anspruch 2, worin besagte fremde Nukleinsäuremoleküle ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus
  - a) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen bewirkt, das SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codiert;
  - b) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen führen, das SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codiert;
  - c) DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von mindestens einem endogenen Gen spaltet, das SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codiert; und
  - d) Mittels in vivo-Mutagenese eingeführte Nukleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem endogenen SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codierenden Gen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression von mindestens einem SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e)

codierenden Gen bewirkt, oder die Synthese von inaktiven SSIII- und/oder BEI- und/oder BEII-Proteinen zur Folge hat;

e) DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen bewirkt, das SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codiert;

f) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration der Transposonsequenzen zu einer Mutation oder einer Insertion in mindestens einem endogenen SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codierenden Gen führt, welche eine Verringerung der Expression von mindestens einem SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codierenden Gen bewirkt, oder die Synthese von inaktiven SSIII- und/oder BEI- und/oder BEII-Proteinen zur Folge hat; und/oder

g) T-DNA Moleküle, die durch Insertion in mindestens einem endogenen SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codierenden Gen eine Verringerung der Expression von mindestens einem SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codierenden Gen bewirken, oder die Synthese von inaktiven SSIII- und/oder BEI- und/oder BEII-Proteinen zur Folge haben.

4. Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, die eine modifizierte Stärke im Vergleich zu einer nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzelle synthetisiert.

5. Pflanzenzelle nach Anspruch 4, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie

- a) einen Amylosegehalt von mindestens 30% enthält,
- b) in Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen einen erhöhten Phosphatgehalt aufweist und
- c) in der RVA Analyse im Vergleich zu nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine erhöhte Endviskosität aufweist.

6. Pflanzenzelle nach Anspruch 4 oder 5, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie im Vergleich zur Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine erhöhte Gelfestigkeit aufweist.



7. Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie im Vergleich zur Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine veränderte Seitenkettenverteilung und/oder eine veränderte Stärkekornmorphologie aufweist.
8. Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 7.
9. Verfahren zur Herstellung einer Pflanzenzelle, die eine modifizierte Stärke synthetisiert, umfassend die genetische Modifikation der Pflanzenzelle, wobei die genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden SSIII-Proteine und zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEI-Proteine und zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEII-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.
10. Verfahren zur Herstellung einer Pflanzenzelle gemäß Anspruch 9, die eine modifizierte Stärke synthetisiert, worin die pflanzliche Zelle genetisch modifiziert wird durch die Einführung eines oder mehrerer fremder Nukleinsäuremoleküle, deren Vorhandensein und/oder Expression zur Verringerung der Aktivität von jeweils mindestens einem SSIII-, BEI- und BEII-Protein führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, worin die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie
  - a) einen Amylosegehalt von mindestens 30% enthält,
  - b) im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen einen erhöhten Phosphatgehalt aufweist und
  - c) in der RVA Analyse im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine erhöhte Endviskosität aufweist.
12. Verfahren zur Herstellung einer genetisch modifizierten Pflanze, wobei
  - a) eine Pflanzenzelle gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11 hergestellt wird;

- b) aus oder mit der gemäß a) hergestellten Pflanzenzelle eine Pflanze regeneriert wird; und
- d) gegebenenfalls aus der gemäß Schritt b) erzeugten Pflanze weitere Pflanzen erzeugt werden.

5

13. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze gemäß Anspruch 12, die eine modifizierte Stärke synthetisiert, worin

- a) eine pflanzliche Zelle genetisch modifiziert wird durch die Einführung eines oder mehrerer fremder Nukleinsäuremoleküle, deren Vorhandensein und/oder

~~10. Expression zur Verringerung der Aktivität von jeweils mindestens einem SSIII-, BEI- und BEII-Protein führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen;~~

- b) aus oder mit der gemäß a) hergestellten Zelle eine Pflanze regeneriert wird; und
- c) aus der gemäß Schritt b) erzeugten Pflanzen gegebenenfalls weitere Pflanzen erzeugt werden.

15

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, worin die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie

- a) einen Amylosegehalt von mindestens 30% enthält und
- b) im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp Pflanzen einen erhöhten Phosphatgehalt aufweist und
- c) im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp Pflanzen eine erhöhte Endviskosität in der RVA Analyse aufweist.

25 15. Pflanze nach Anspruch 8 oder erhältlich nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14, die eine stärkepeichernde Pflanze ist.

16. Pflanze nach Anspruch 15, die eine Kartoffelpflanze ist.

30 17. Vermehrungsmaterial von Pflanzen nach einem der Ansprüche 8 oder 15 bis 16, enthaltend mindestens eine Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 7.

18. Verwendung eines oder mehrerer Nukleinsäuremoleküle, die Proteine mit der enzymatischen Aktivität von mindestens einem SSIII-, mindestens einem BEI-,

und/oder mindestens einem BEII-Protein oder deren Fragmente codieren, zur Herstellung von Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder von Pflanzen nach einem der Ansprüche 8 oder 15 bis 16.

- 5 19. Verwendung eines oder mehrerer Nukleinsäuremoleküle zur Herstellung von Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder von Pflanzen nach einem der Ansprüche 8 oder 15 bis 16, wobei das fremde Nukleinsäuremolekül oder die fremden Nukleinsäuremoleküle ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus :
  - 10 a) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen bewirkt, das SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und /oder BEII-Protein(e) codiert;
  - b) DNA-Moleküle, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen führen, das SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codiert;
  - 15 c) DNA-Moleküle, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von mindestens einem endogenen Gen spaltet, das SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codiert;
  - d) Mittels in vivo Mutagenese eingeführte Nukleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem endogenen SSIII- Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codierenden Gen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression von mindestens einem SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codierenden Gen bewirkt, oder die Synthese von inaktiven SSIII-Proteinen und/oder BEI-Proteinen und/oder BEII-Proteinen zur Folge hat;
  - 20 e) DNA-Moleküle, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen bewirkt, das SSIII-Proteine und/oder BEI-Proteine und/oder BEII-Proteine codiert;
  - 25 f) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration der Transposonsequenzen zu einer Mutation oder einer Insertion in mindestens einem endogenen SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codierenden Gen führt, welche eine Verringerung der Expression von mindestens einem SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e)
  - 30

codierenden Gen bewirkt, oder die Synthese von inaktiven SSIII- und/oder BEI- und/oder BEII-Proteinen zur Folge haben; und

- g) T-DNA Moleküle, die durch Insertion in mindestens einem endogenen SSIII-Proteine und/oder BEI-Proteine und/oder BEII-Proteine codierenden Gen eine Verringerung der Expression von mindestens einem SSIII-Protein(e) und/oder BEI-Protein(e) und/oder BEII-Protein(e) codierenden Gen bewirken, oder die Synthese von inaktiven SSIII- und/oder BEI- und/oder BEII-Proteinen zur Folge haben.

20. Zusammensetzung, enthaltend mindestens eines der in Anspruch 19 definierten

- ~~1.0 Nukleinsäuremoleküle, wobei das mindestens eine Nukleinsäuremolekül nach~~  
Einführung in eine Pflanzenzelle zur Verringerung mindestens eines endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden SSIII-Proteins und mindestens eines endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEII-Proteins, und vorzugsweise weiterhin zur Verringerung mindestens eines endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEI-Proteins führt.

21. Zusammensetzung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das Vorhandensein des mindestens einen Nukleinsäuremoleküls in den besagten Pflanzenzellen zur Verringerung der Aktivität von jeweils mindestens einem SSIII- und BEI und BEII-Protein führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.

22. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 20 bis 21, wobei die Nukleinsäuremoleküle in einem rekombinanten Nukleinsäuremolekül enthalten sind.

23. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 20 bis 22 oder enthaltend mindestens eines der in Anspruch 19 definierten Nukleinsäuremoleküle zur Herstellung einer Pflanzenzelle mit verringerter Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden SSIII-Proteine und verringerter Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEI-Proteine und verringerter Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEII-Proteine, im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

24. Transformationssystem für Pflanzenzellen, enthaltend mindestens ein Nukleinsäuremolekül und mindestens eine Pflanzenzelle, wobei das mindestens eine Nukleinsäuremolekül zur Verringerung der Aktivität jeweils mindestens eines der endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden SSIII-, BEI- und BE-II-Proteine führt, soweit diese nicht bereits durch eine vorherige genetische Modifikation der besagten Pflanzenzelle in ihrer Aktivität verringert wurden.
25. Wirtszelle, enthaltend eine Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 20 bis 22.
26. Wirtszelle nach Anspruch 25, die eine transgene Pflanzenzelle enthaltend die Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 20 bis 22 ist.
27. Stärke, erhältlich aus Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 26 oder aus einer Pflanze nach einem der Ansprüche 8 oder 15 bis 16 oder aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 17.
28. Stärke nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass sie
- a) einen Amylosegehalt von mindestens 30% enthält,
  - b) in Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen einen erhöhten Phosphatgehalt aufweist und
  - c) in der RVA Analyse im Vergleich zu nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine erhöhte Endviskosität aufweist.
29. Stärke nach Anspruch 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, dass sie im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine veränderte Seitenkettenverteilung aufweist.
30. Stärke nach einem der Ansprüche 27 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Stärkekörner in Vergleich zu nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine veränderte Stärkekornmorphologie und/oder eine veränderte mittlere Stärkekorngröße aufweisen.
31. Stärke nach einem der Ansprüche 27 bis 30, die eine Kartoffelstärke ist.

32. Verfahren zur Herstellung einer Stärke nach einem der Ansprüche 27 bis 31, umfassend die Extraktion der Stärke aus einer Pflanze nach einem der Ansprüche 8 oder 15 bis 16 und/oder aus stärke-speichernden Teilen einer solchen Pflanze und/oder aus einer Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 26 und/oder aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 17.

33. Stärke nach einem der Ansprüche 27 bis 31, erhältlich durch ein Verfahren nach Anspruch 32.

34. Stärke nach einem der Ansprüche 27 bis 31 oder 33, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens eine der folgenden Eigenschaften aufweist:

- a) eine Endviskosität in der RVA-Analyse mit einer 6 %igen (w/w) wässrigen Stärkesuspension von mindestens 300 RVU, bevorzugt von mindestens 400 RVU, insbesondere von mindestens 500 RVU;
- b) in der C6-Position der Glucosemonomere der Stärke einen Phosphatgehalt von 40 bis 120 nmol, bevorzugt von 60 bis 100 nmol, und insbesondere von 80 bis 100 nmol C6-P pro mg Stärke;
- c) in nativer Form eine poröse Oberfläche der Stärkekörner.

35. Verarbeitungsprodukt, insbesondere Nahrungs- oder Futtermittel, Farbe, Klebstoff, Bau- oder Dämmstoff, enthaltend eine Stärke gemäß einem der Ansprüche 27 bis 31, 33 oder 34.

36. Stärkehaltiger Teil einer Pflanze gemäß einem der Ansprüche 8, 15 oder 16.

37. Verfahren zur Modifikation der Stärke einer Pflanze, umfassend das Verfahren zur Herstellung einer Pflanze gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14 sowie die Gewinnung von Stärke aus der Pflanze oder stärkehaltigen Teilen davon.

38. Verfahren gemäß Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, dass die Modifikation der Stärke umfasst:

- a) die Erhöhung des Amylosegehaltes der Stärke;

- b) die Erhöhung des Phosphatgehaltes der Stärke, insbesondere auf einen Phosphatgehalt in der C6-Position der Glucosemonomere der Stärke von 40 bis 120 nmol, bevorzugt von 60 bis 100 nmol, und insbesondere von 80 bis 100 nmol C6-P pro mg Stärke;
- 5 c) die Erhöhung der Endviskosität der Stärke, insbesondere auf eine Endviskosität in der RVA-Analyse mit einer 6 %igen (w/w) wässrigen Stärkesuspension von mindestens 300 RVU, bevorzugt von mindestens 400 RVU, insbesondere von mindestens 500 RVU;
- d) die Erhöhung der Gelfestigkeit der gelatinisierten Stärke und/oder
- 10 e) die Morphologie, insbesondere die Oberflächenstruktur, Porosität und/oder Korngrößenverteilung der nativen Stärkekörner.

**Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Pflanzenzelle, die genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden SSIII-Proteine und zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEI-Proteine und zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEII-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen. Weitere Aspekte der Erfindung betreffen solche Pflanzenzellen enthaltende Pflanzen, ein Verfahren zur Herstellung der Pflanzenzellen und Pflanzen sowie die daraus erhältliche Stärke.



## RVA-Analysemethode 1

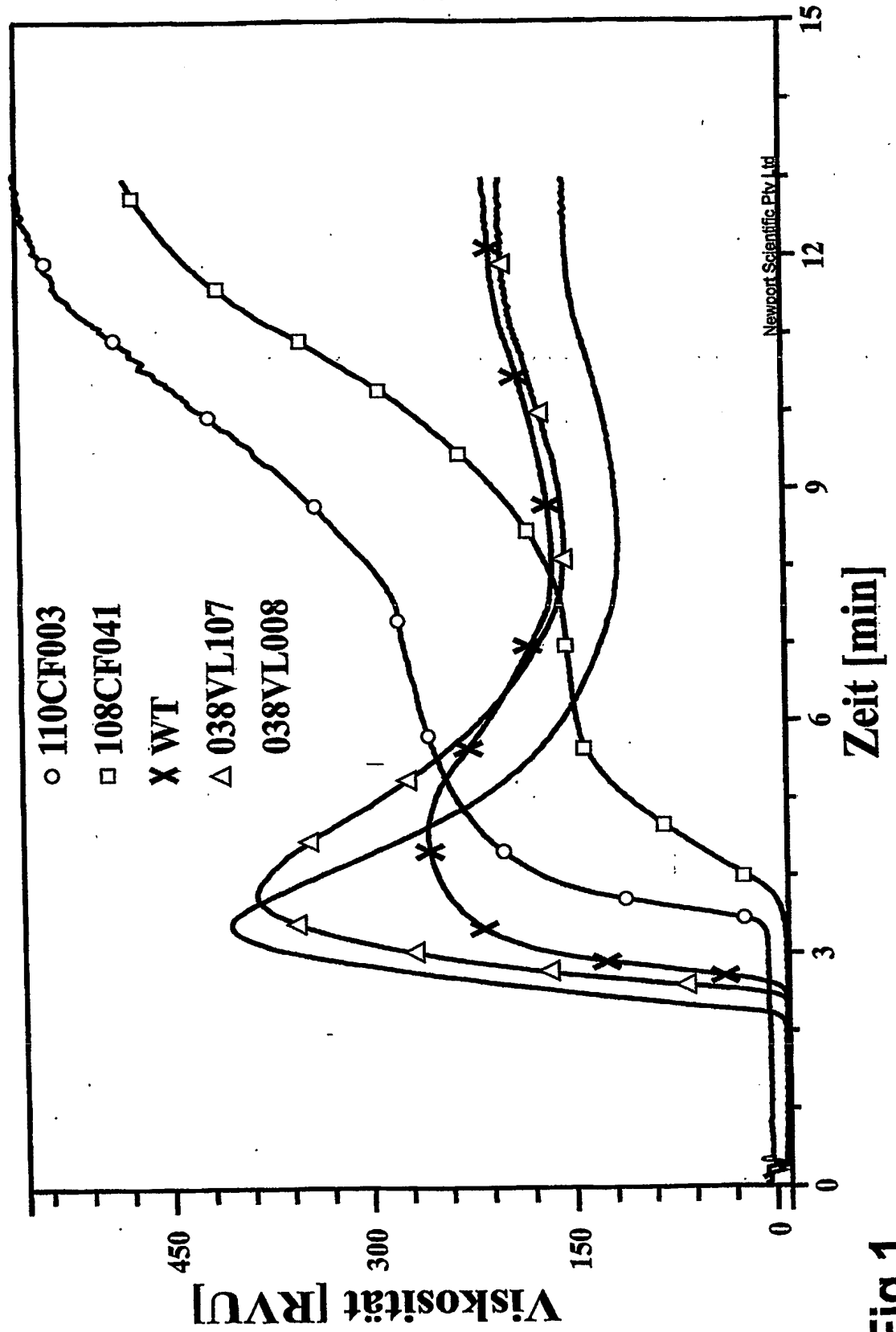


Fig 1

# RVA-Analysemethode 2

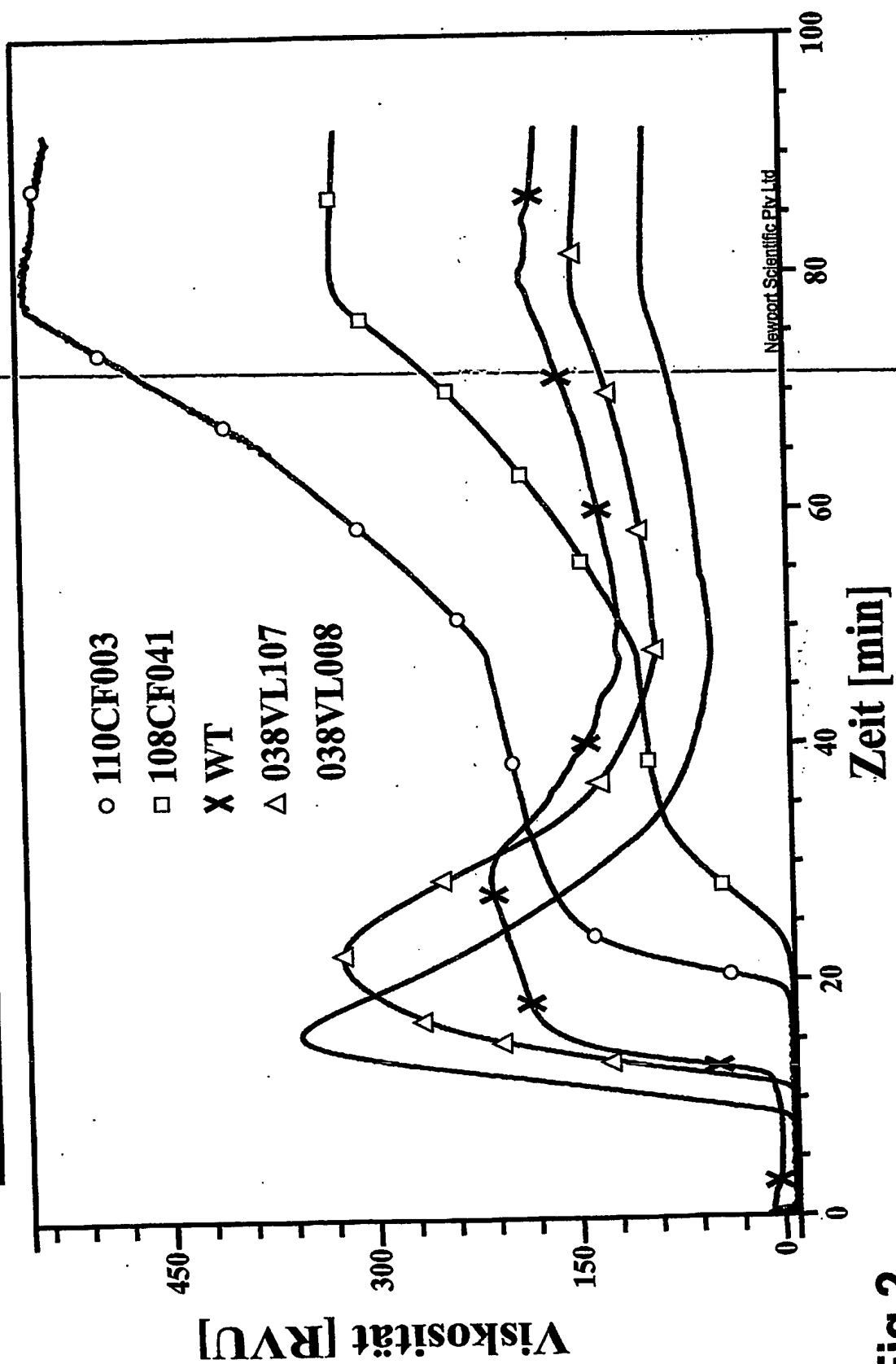


Fig 2

### RVA-Analysemethode 3

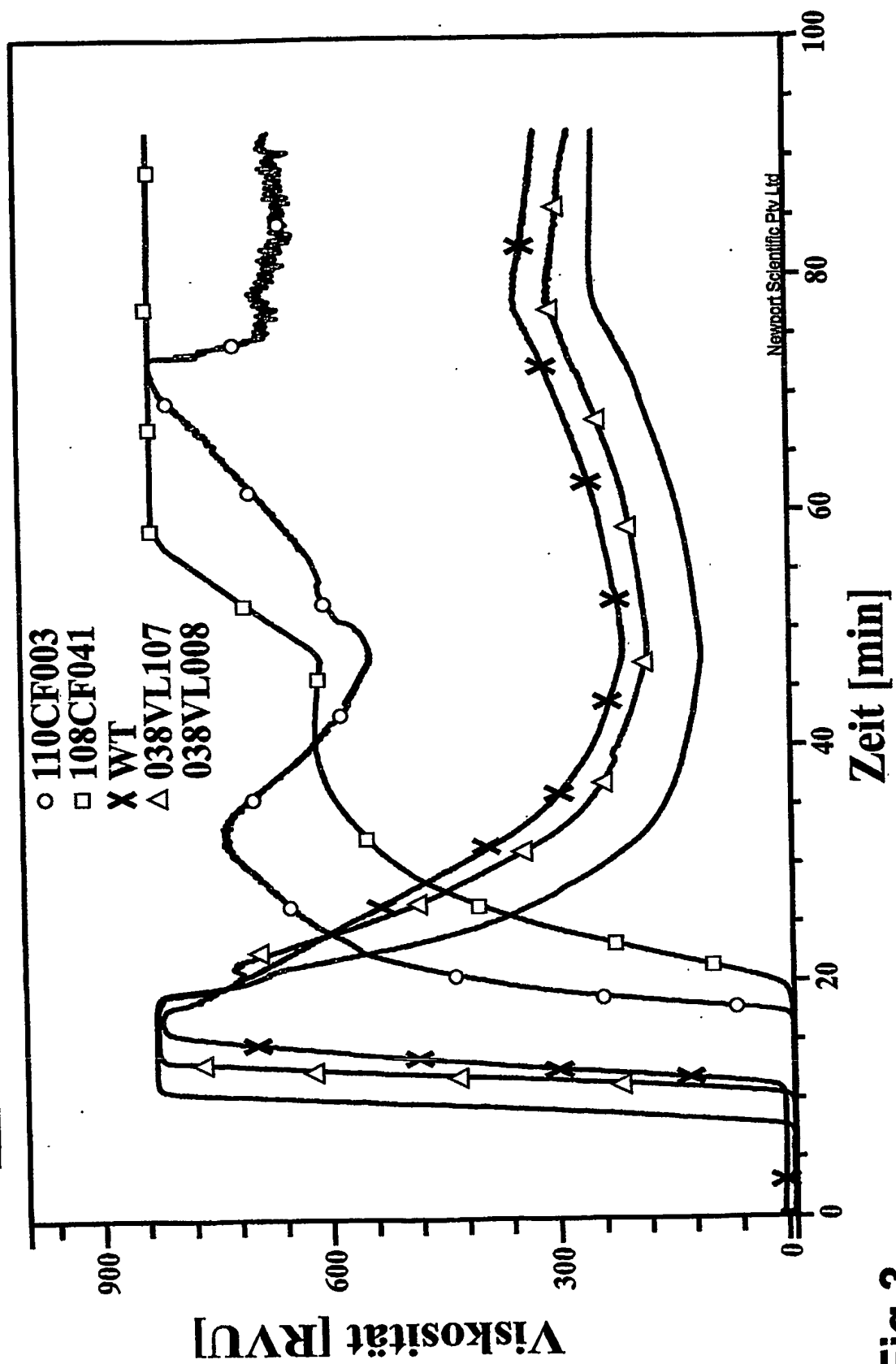
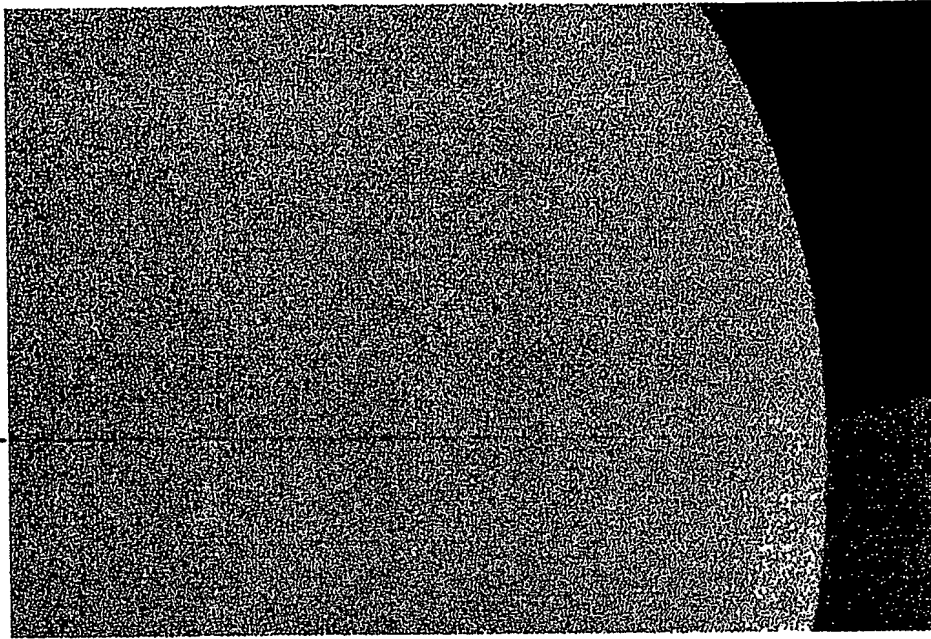


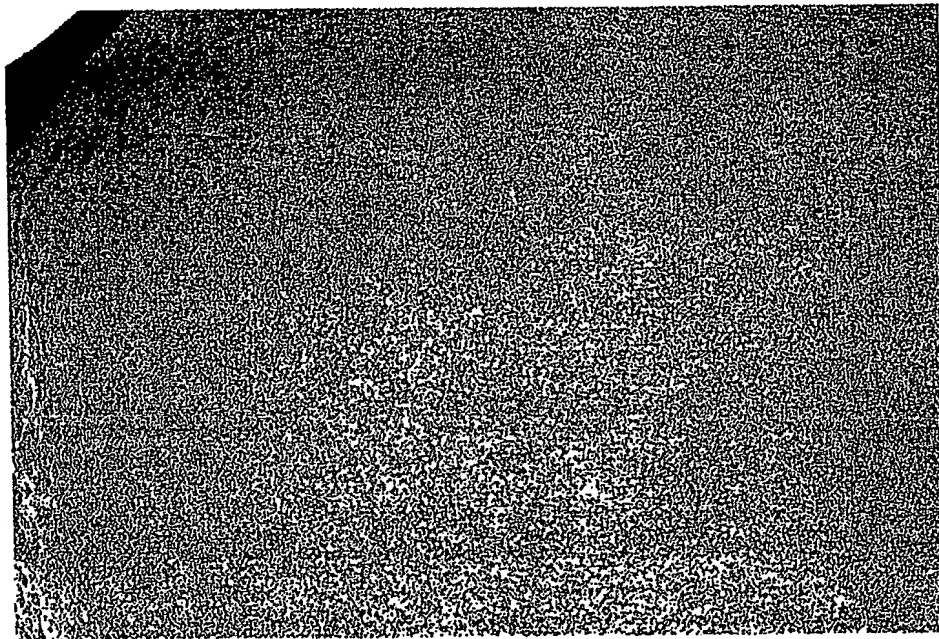
Fig 3

4 von 11



— 1 µm

**Fig 4**



— 1 µm

**Fig 5**

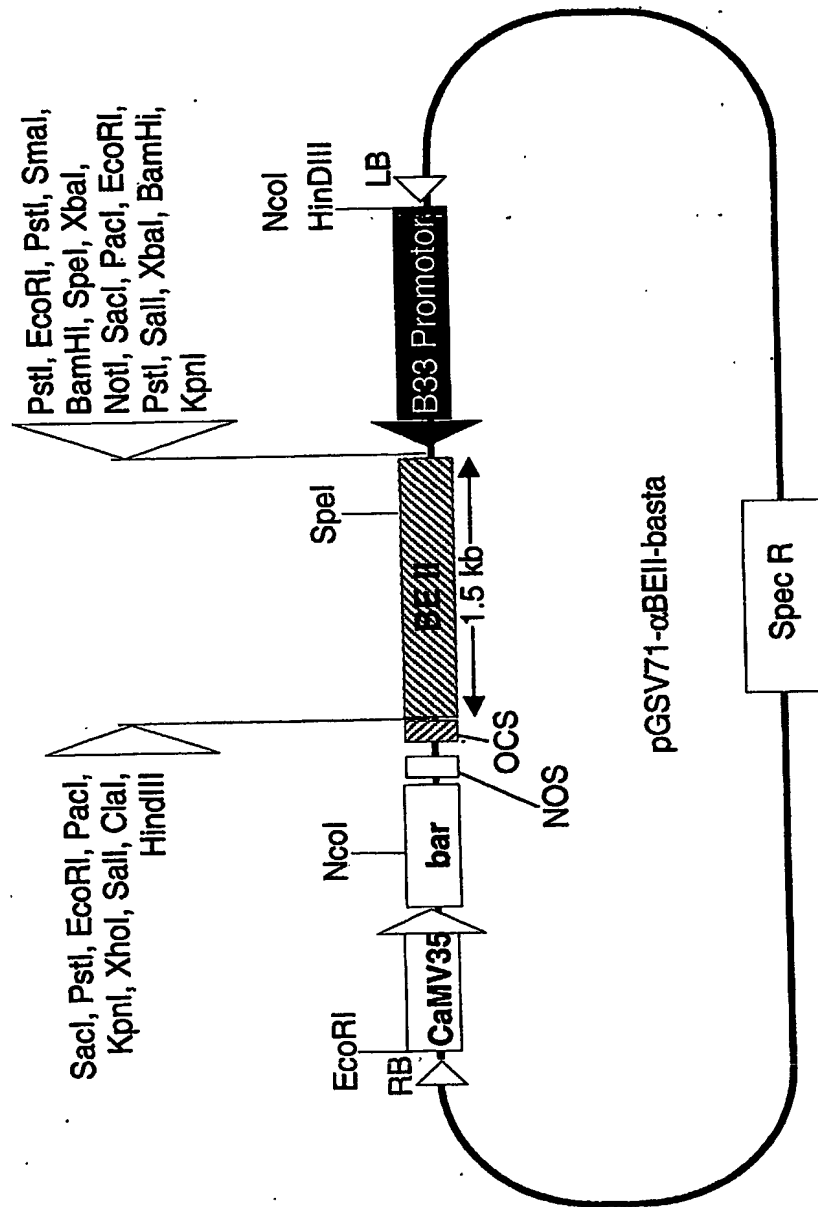


Fig 6

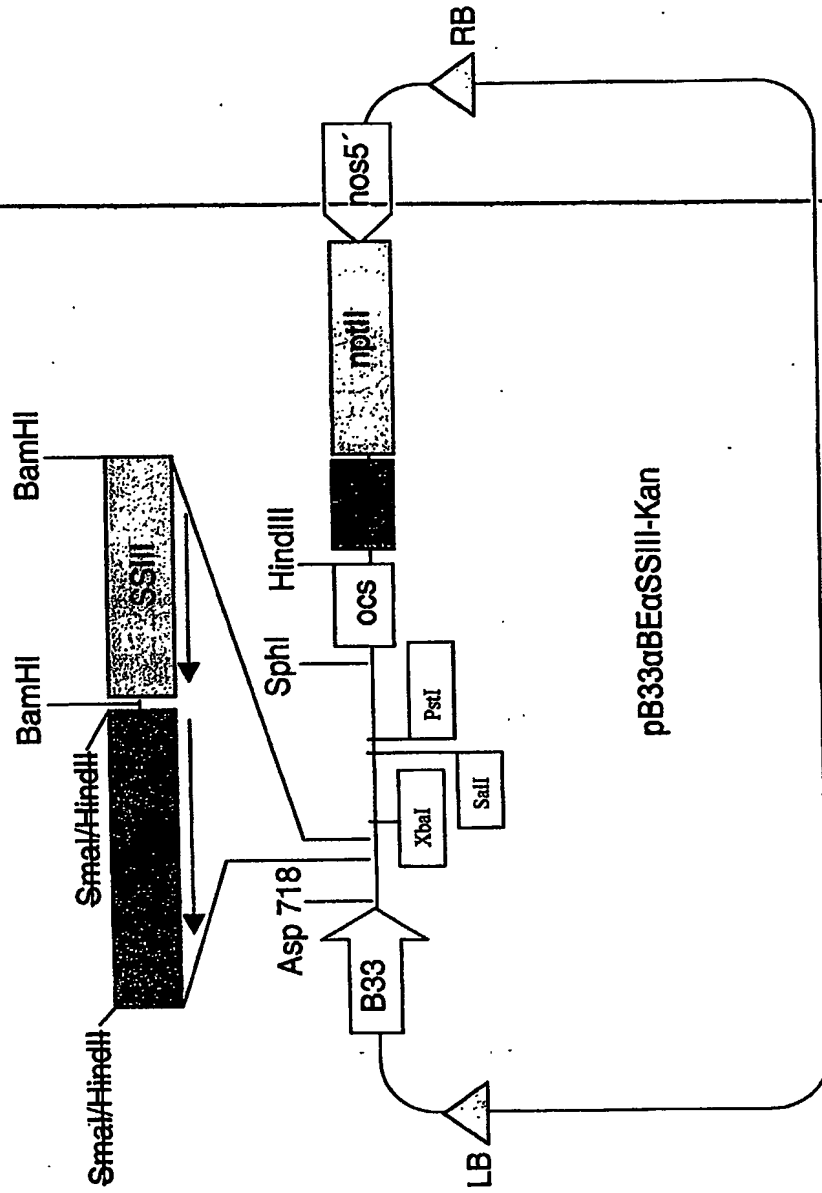


Fig 7

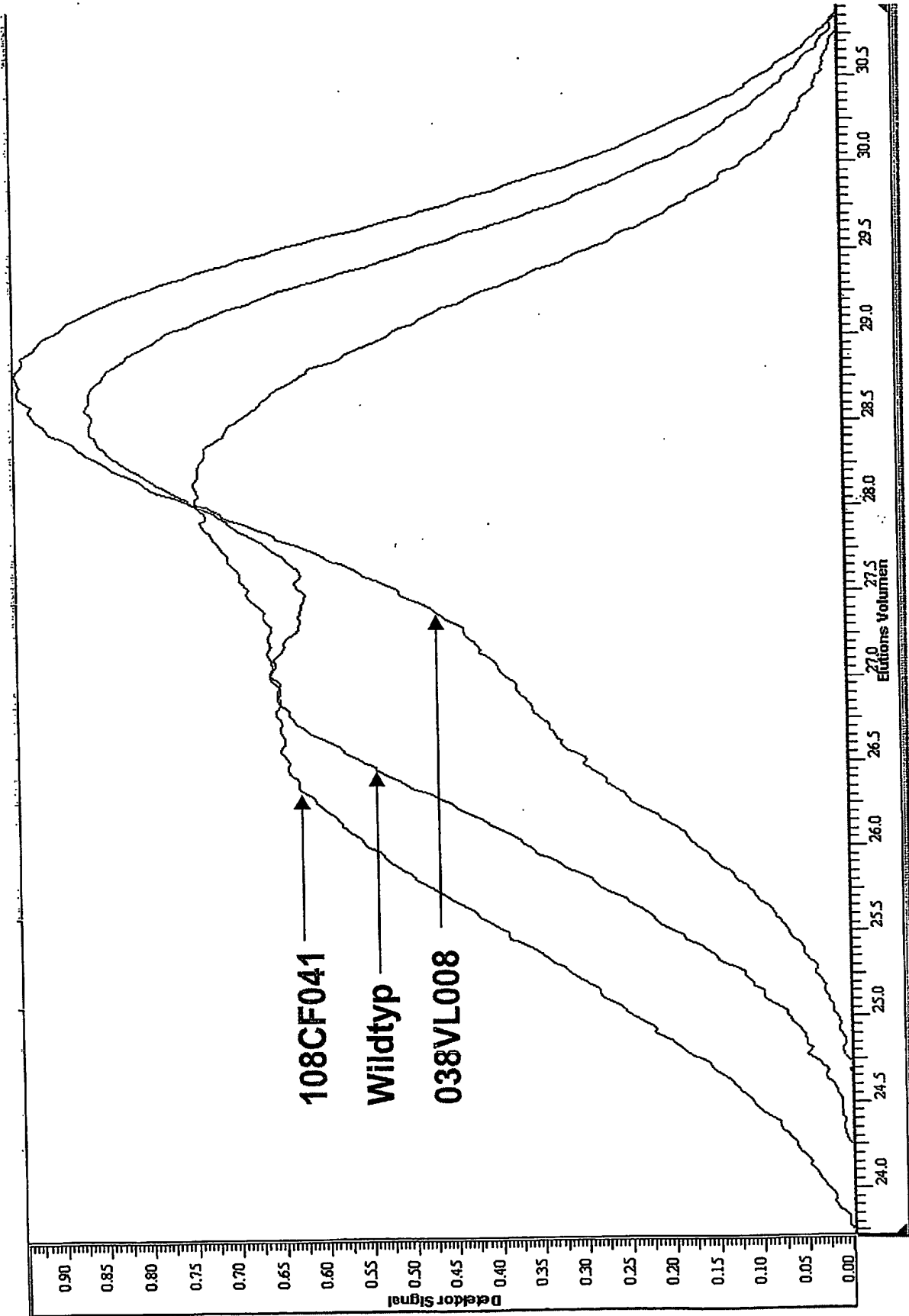
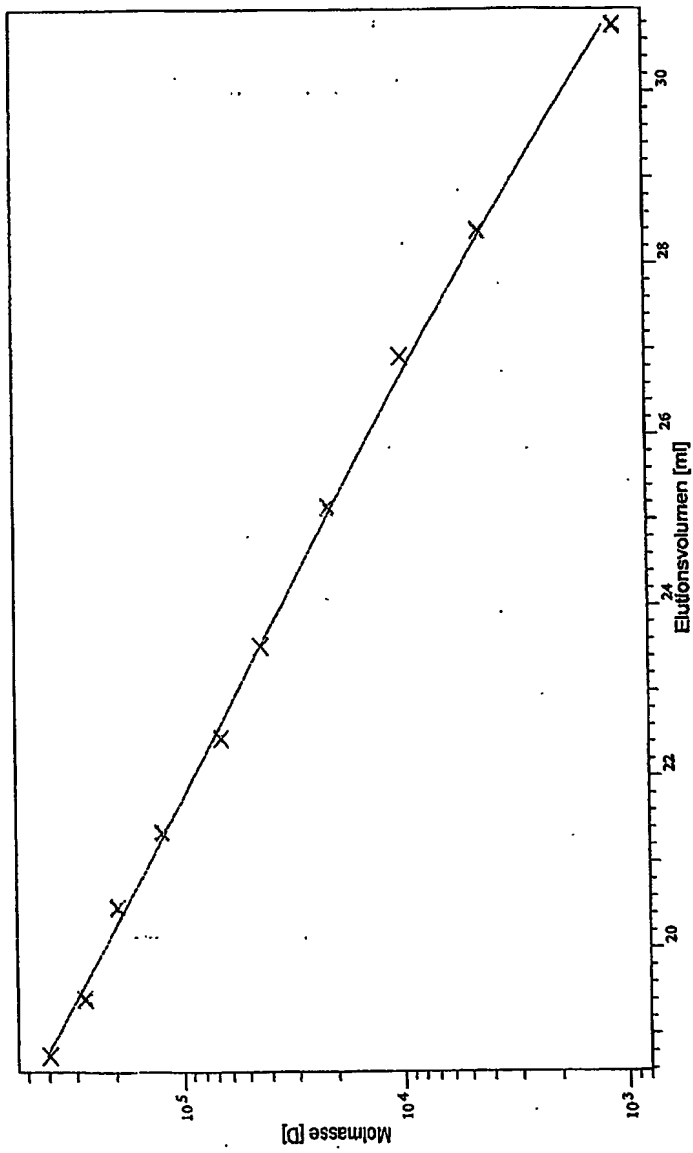


Fig. 8



Kalibriertabelle:

Elutionsvolumen [ml]	Molmasse [D]	Probenname
18.76	401300	Dextran T670
19.41	276500	Dextran T410
20.49	196300	Dextran T270
21.35	123600	Dextran T150
22.45	66700	Dextran T80
23.52	43500	Dextran T50
25.15	21400	Dextran T25
26.92	9890	Dextran T12
28.38	4440	Dextran T5
30.77	1080	Dextran T1

Fig 9



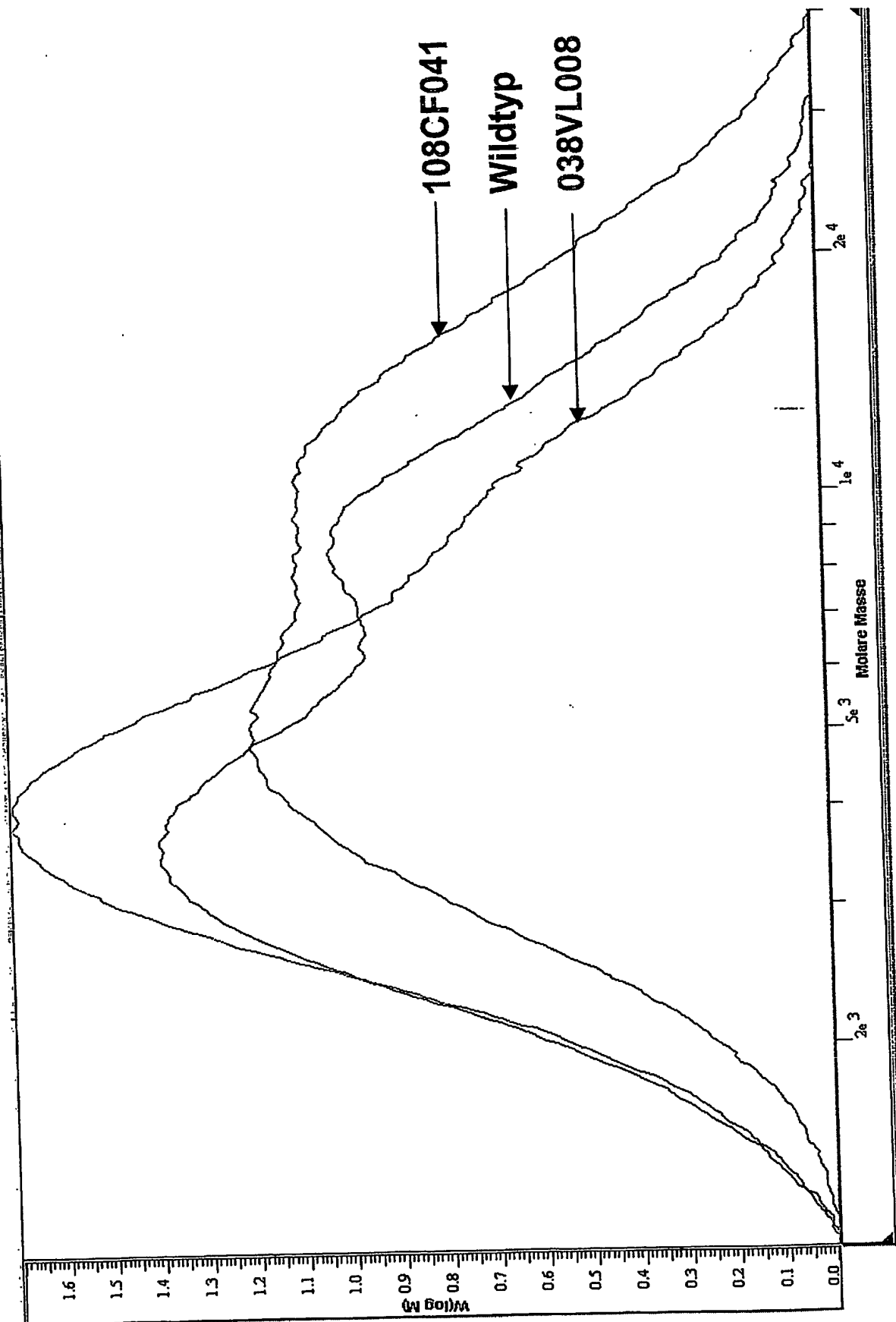


Fig 10

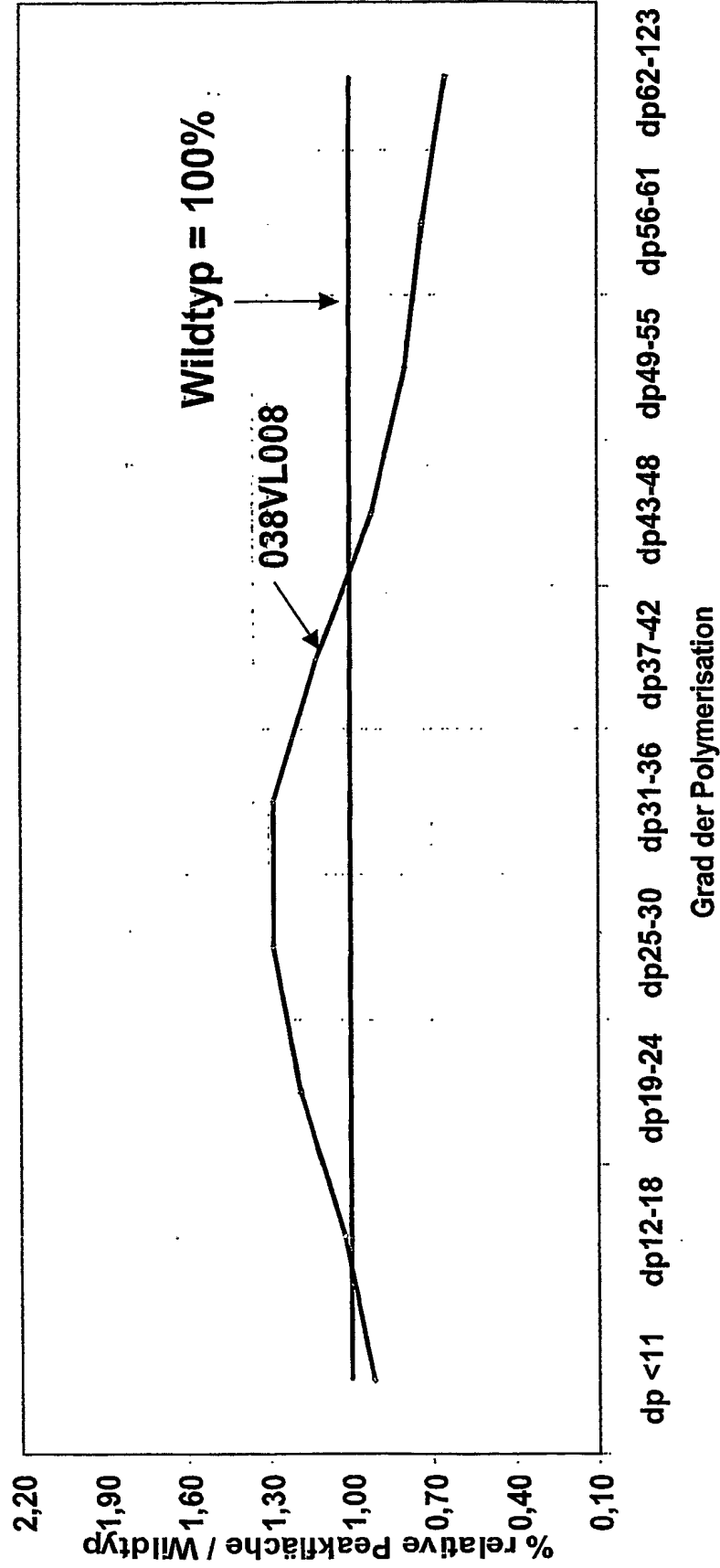


Fig 11

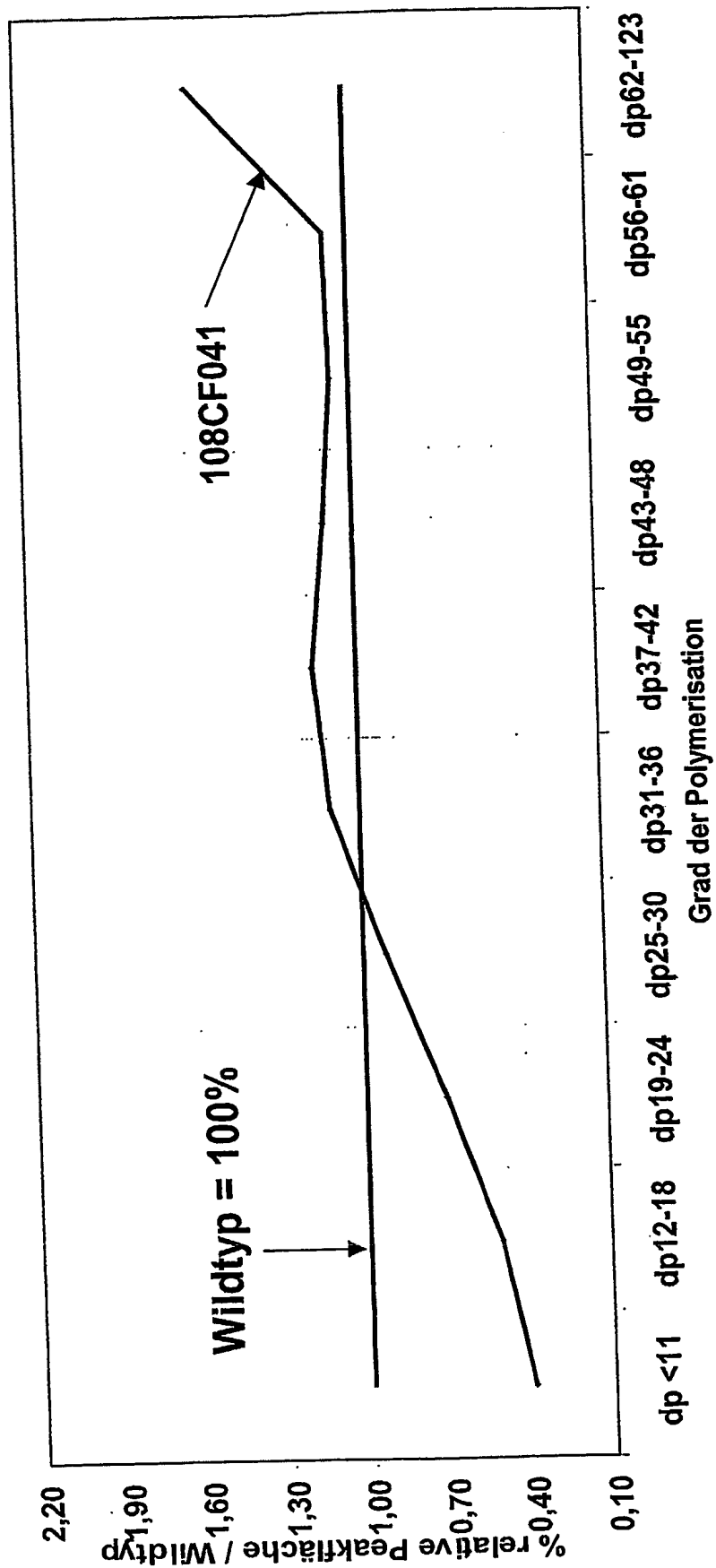


Fig 12

BCS 03 5003.ST25.txt  
SEQUENCE LISTING

<110> Bayer CropScience GmbH

<120> Pflanzen, die eine Stärke mit erhöhter Endviskosität synthetisieren

<130> BCS 03 5003

<160> 8

EP  
2 9 -08- 2003

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4167

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<220>

<221> CDS

<222> (207) .. (3899)

<223>

<300>

<301> Abel, G.J., Springer, F., Willmitzer, L. and Kossmann, J.

<302> Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa

<303> Plant J.

```
<300>
<308>  EMBL / X94400
<309>  1997-04-16
<313>  (1)..(4167)
```

<400>	1	ttttttaata gattttttaaa accccattaa agcaaatacg tatataattg cagcacagat	60
acagagaggg agagagaaag atagtgtggt gatgaaggag aagagagata tttcacatgg			120
gatgttctat ttgattctgt ggtgaacaag agttttacaa agaacattcc tttttctttt			180
tttcttggtt cttgtgtggg tcagcc atg gat gtt cca ttt cca ctg cat aga			233
	Met Asp Val Pro Phe Pro Leu His Arg		
	1 5		
cca ttg agt tgc aca agt gtc tcc aat gca ata acc cac ctc aag atc			281
Pro Leu Ser Cys Thr Ser Val Ser Asn Ala Ile Thr His Leu Lys Ile			
10 15 20 25			
aaa cct ttt ctt ggg ttt gtc tct cat gga acc aca agt cta tca gta			329
Lys Pro Phe Leu Gly Phe Val Ser His Gly Thr Thr Ser Leu Ser Val			
30 35 40			
caa tct tct tca tgg agg aag gat gga atg gtt act ggg gtt tca ttt			377
Gln Ser Ser Ser Trp Arg Lys Asp Gly Met Val Thr Gly Val Ser Phe			
45 50 55			
cca ttt tgt gca aat ctc tcg gga aga aga cgg aga aaa gtt tca act			425
Pro Phe Cys Ala Asn Leu Ser Gly Arg Arg Arg Arg Lys Val Ser Thr			
60 65 70			

## BCS 03 5003.ST25.txt

ct agg agt caa gga tct tca cct aag ggg ttt gtg cca agg aag ccc	473
hr Arg Ser Gln Gly Ser Ser Pro Lys Gly Phe Val Pro Arg Lys Pro	
75 80 85	
ca ggg atg agc acg caa aga aag gtt cag aag agc aat ggt gat aaa	521
er Gly Met Ser Thr Gln Arg Lys Val Gln Lys Ser Asn Gly Asp Lys	
0 95 100 105	
aa agt caa agt act tca aca tct aaa gaa tct gaa att tcc aac cag	569
lu Ser Gln Ser Thr Ser Thr Ser Lys Glu Ser Glu Ile Ser Asn Gln	
110 115 120	
ag acg gtt gaa gca aga gtt gaa act agt gac gat gac act aaa gta	617
ys Thr Val Glu Ala Arg Val Glu Thr Ser Asp Asp Asp Thr Lys Val	
125 130 135	
tg gtg agg gac cac aag ttt ctg gag gat gag gat gaa atc aat ggt	665
al Val Arg Asp His Lys Phe Leu Glu Asp Glu Asp Glu Ile Asn Gly	
140 145 150	
ct act aaa tca ata agt atg tca cct gtt cgt gta tca tct caa ttt	713
er Thr Lys Ser Ile Ser Met Ser Pro Val Arg Val Ser Ser Gln Phe	
155 160 165	
tt gaa agt gaa gaa act ggt ggt gat gac aag gat gct gta aag tta	761
al Glu Ser Glu Glu Thr Gly Gly Asp Asp Lys Asp Ala Val Lys Leu	
170 175 180 185	
ac aaa tca aag aga tcg gaa gag agt gat ttt cta att gat tct gta	809
asn Lys Ser Lys Arg Ser Glu Glu Ser Asp Phe Leu Ile Asp Ser Val	
190 195 200	
ta aga gaa caa agt gga tct cag ggg gaa act aat gcc agt agc aag	857
le Arg Glu Gln Ser Gly Ser Gln Gly Glu Thr Asn Ala Ser Ser Lys	
205 210 215	
ga agc cat gct gtg ggt aca aaa ctt tat gag ata ttg cag gtg gat	905
gly Ser His Ala Val Gly Thr Lys Leu Tyr Glu Ile Leu Gln Val Asp	
220 225 230	
tt gag cca caa caa ttg aaa gaa aat aat gct ggg aat gtt gaa tac	953
val Glu Pro Gln Gln Leu Lys Glu Asn Asn Ala Gly Asn Val Glu Tyr	
235 240 245	
aaa gga cct gta gca agt aag cta ttg gaa att act aag gct agt gat	1001
lys Gly Pro Val Ala Ser Lys Leu Leu Glu Ile Thr Lys Ala Ser Asp	
250 255 260 265	
gtg gaa cac act gaa agc aat gag att gat gac tta gac act aat agt	1049
val Glu His Thr Glu Ser Asn Glu Ile Asp Asp Leu Asp Thr Asn Ser	
270 275 280	

## BCS 03 5003.ST25.txt

ttc ttt aaa tca gat tta att gaa gag gat gag cca tta gct gca gga	1097
Phe Phe Lys Ser Asp Leu Ile Glu Glu Asp Glu Pro Leu Ala Ala Gly	
285 290 295	
aca gtg gag act gga gat tct tct cta aac tta aga ttg gag atg gaa	1145
Thr Val Glu Thr Gly Asp Ser Ser Leu Asn Leu Arg Leu Glu Met Glu	
300 305 310	
gca aat cta cgt agg cag gct ata gaa agg ctt gcc gag gaa aat tta	1193
Ala Asn Leu Arg Arg Gln Ala Ile Glu Arg Leu Ala Glu Glu Asn Leu	
315 320 325	
ttg caa ggg atc aga tta ttt tgt ttt cca gag gtt gta aaa cct gat	1241
Leu Gln Gly Ile Arg Leu Phe Cys Phe Pro Glu Val Val Lys Pro Asp	
330 335 340 345	
gaa gat gtc gag ata ttt ctt aac aga ggt ctt tcc act ttg aag aat	1289
Glu Asp Val Glu Ile Phe Leu Asn Arg Gly Leu Ser Thr Leu Lys Asn	
350 355 360	
gag tct gat gtc ttg att atg gga gct ttt aat gag tgg cgc tat agg	1337
Glu Ser Asp Val Leu Ile Met Gly Ala Phe Asn Glu Trp Arg Tyr Arg	
365 370 375	
tct ttt act aca agg cta act gag act cat ctc aat gga gat tgg tgg	1385
Ser Phe Thr Thr Arg Leu Thr Glu Thr His Leu Asn Gly Asp Trp Trp	
380 385 390	
tct tgc aag atc cat gtt ccc aag gaa gca tac agg gct gat ttt gtg	1433
Ser Cys Lys Ile His Val Pro Lys Glu Ala Tyr Arg Ala Asp Phe Val	
395 400 405	
ttt ttt aat gga caa gat gtc tat gac aac aat gat gga aat gac ttc	1481
Phe Phe Asn Gly Gln Asp Val Tyr Asp Asn Asn Asp Gly Asn Asp Phe	
410 415 420 425	
agt ata act gtg aaa ggt ggt atg caa atc att gac ttt gaa aat ttc	1529
Ser Ile Thr Val Lys Gly Gly Met Gln Ile Ile Asp Phe Glu Asn Phe	
430 435 440	
ttg ctt gag gag aaa tgg aga gaa cag gag aaa ctt gct aaa gaa caa	1577
Leu Leu Glu Glu Lys Trp Arg Glu Gln Glu Lys Leu Ala Lys Glu Gln	
445 450 455	
gct gaa aga gaa aga cta gcg gaa gaa caa aga cga ata gaa gca gag	1625
Ala Glu Arg Glu Arg Leu Ala Glu Glu Glu Gln Arg Arg Ile Glu Ala Glu	
460 465 470	
aaa gct gaa att gaa gct gac aga gca caa gca aag gaa gag gct gca	1673
Lys Ala Glu Ile Glu Ala Asp Arg Ala Gln Ala Lys Glu Glu Ala Ala	
475 480 485	

## BCS 03 5003.ST25.txt

ag aaa aag aaa gta ttg cga gaa ttg atg gta aaa gcc acg aag act	1721
lys Lys Lys Lys Val Leu Arg Glu Leu Met Val Lys Ala Thr Lys Thr	
90 495 500 505	
agt gat atc acg tgg tac ata gag cca agt gaa ttt aaa tgc gag gac	1769
arg Asp Ile Thr Trp Tyr Ile Glu Pro Ser Glu Phe Lys Cys Glu Asp	
510 515 520	
ag gtc agg tta tac tat aac aaa agt tca ggt cct ctc tcc cat gct	1817
lys Val Arg Leu Tyr Tyr Asn Lys Ser Ser Gly Pro Leu Ser His Ala	
525 530 535	
ag gac ttg tgg atc cac gga gga tat aat aat tgg aag gat ggt ttg	1865
lys Asp Leu Trp Ile His Gly Gly Tyr Asn Asn Trp Lys Asp Gly Leu	
540 545 550	
ct att gtc aaa aag ctt gtt aaa tct gag aga ata gat ggt gat tgg	1913
ser Ile Val Lys Lys Leu Val Lys Ser Glu Arg Ile Asp Gly Asp Trp	
555 560 565	
gg tat aca gag gtt gtt att cct gat cag gca ctt ttc ttg gat tgg	1961
trp Tyr Thr Glu Val Val Ile Pro Asp Gln Ala Leu Phe Leu Asp Trp	
570 575 580 585	
ttt ttt gct gat ggt cca ccc aag cat gcc att gct tat gat aac aat	2009
val Phe Ala Asp Gly Pro Pro Lys His Ala Ile Ala Tyr Asp Asn Asn	
590 595 600	
cac cgc caa gac ttc cat gcc att gtc ccc aac cac att ccg gag gaa	2057
his Arg Gln Asp Phe His Ala Ile Val Pro Asn His Ile Pro Glu Glu	
605 610 615	
ata tat tgg gtt gag gaa gaa cat cag atc ttt aag aca ctt cag gag	2105
leu Tyr Trp Val Glu Glu Glu His Gln Ile Phe Lys Thr Leu Gln Glu	
620 625 630	
ag aga agg ctt aga gaa gcg gct atg cgt gct aag gtt gaa aaa aca	2153
glu Arg Arg Leu Arg Glu Ala Ala Met Arg Ala Lys Val Glu Lys Thr	
635 640 645	
gca ctt ctg aaa act gaa aca aag gaa aga act atg aaa tca ttt tta	2201
ala Leu Leu Lys Thr Glu Thr Lys Glu Arg Thr Met Lys Ser Phe Leu	
650 655 660 665	
ctg tct cag aag cat gta gta tat act gag cct ctt gat atc caa gct	2249
leu Ser Gln Lys His Val Val Tyr Thr Glu Pro Leu Asp Ile Gln Ala	
670 675 680	
gga agc agc gtc aca gtt tac tat aat ccc gcc aat aca gta ctt aat	2297
gly Ser Ser Val Thr Val Tyr Tyr Asn Pro Ala Asn Thr Val Leu Asn	
685 690 695	



## BCS 03 5003.ST25.txt

ggt aaa cct gaa att tgg ttc aga tgt tca ttt aat cgc tgg act cac	2345
Gly Lys Pro Glu Ile Trp Phe Arg Cys Ser Phe Asn Arg Trp Thr His	
700 705 710	
cgc ctg ggt cca ttg cca cct cag aaa atg tcg cct gct gaa aat ggc	2393
Arg Leu Gly Pro Leu Pro Pro Gln Lys Met Ser Pro Ala Glu Asn Gly	
715 720 725	
acc cat gtc aga gca act gtg aag gtt cca ttg gat gca tat atg atg	2441
Thr His Val Arg Ala Thr Val Lys Val Pro Leu Asp Ala Tyr Met Met	
730 735 740 745	
gat ttt gta ttt tcc gag aga gaa gat ggt ggg att ttt gac aat aag	2489
Asp Phe Val Phe Ser Glu Arg Glu Asp Gly Gly Ile Phe Asp Asn Lys	
750 755 760	
agc gga atg gac tat cac ata cct gtg ttt gga gga gtc gct aaa gaa	2537
Ser Gly Met Asp Tyr His Ile Pro Val Phe Gly Gly Val Ala Lys Glu	
765 770 775	
cct cca atg cat att gtc cat att gct gtc gaa atg gca cca att gca	2585
Pro Pro Met His Ile Val His Ile Ala Val Glu Met Ala Pro Ile Ala	
780 785 790	
aag gtg gga ggc ctt ggt gat gtt gtt act agt ctt tcc cgt gct gtt	2633
Lys Val Gly Gly Leu Gly Asp Val Val Thr Ser Leu Ser Arg Ala Val	
795 800 805	
caa gat tta aac cat aat gtg gat att atc tta cct aag tat gac tgt	2681
Gln Asp Leu Asn His Asn Val Asp Ile Ile Leu Pro Lys Tyr Asp Cys	
810 815 820 825	
ttg aag atg aat aat gtg aag gac ttt cgg ttt cac aaa aac tac ttt	2729
Leu Lys Met Asn Asn Val Lys Asp Phe Arg Phe His Lys Asn Tyr Phe	
830 835 840	
tgg ggt ggg act gaa ata aaa gta tgg ttt gga aag gtg gaa ggt ctc	2777
Trp Gly Gly Thr Glu Ile Lys Val Trp Phe Gly Lys Val Glu Gly Leu	
845 850 855	
tcg gtc tat ttt ttg gag cct caa aac ggg tta ttt tcg aaa ggg tgc	2825
Ser Val Tyr Phe Leu Glu Pro Gln Asn Gly Leu Phe Ser Lys Gly Cys	
860 865 870	
gtc tat ggt tgt agc aat gat ggt gaa cga ttt ggt ttc ttc tgt cac	2873
Val Tyr Gly Cys Ser Asn Asp Gly Glu Arg Phe Gly Phe Phe Cys His	
875 880 885	
gcg gct ttg gag ttt ctt ctg caa ggt gga ttt agt ccg gat atc att	2921
Ala Ala Leu Glu Phe Leu Leu Gln Gly Gly Phe Ser Pro Asp Ile Ile	
890 895 900 905	

## BCS 03 5003.ST25.txt

at tgc cat gat tgg tct agt gct cct gtt gct tgg ctc ttt aag gaa	2969
is Cys His Asp Trp Ser Ser Ala Pro Val Ala Trp Leu Phe Lys Glu	
910 915 920	
aa tat aca cac tat ggt cta agc aaa tct cgt ata gtc ttc acg ata	3017
ln Tyr Thr His Tyr Gly Leu Ser Lys Ser Arg Ile Val Phe Thr Ile	
925 930 935	
at aat ctt gaa ttt ggg gca gat ctc att ggg aga gca atg act aac	3065
is Asn Leu Glu Phe Gly Ala Asp Leu Ile Gly Arg Ala Met Thr Asn	
940 945 950	
ca gac aaa gct aca aca gtt tca cca act tac tca cag gag gtg tct	3113
Ala Asp Lys Ala Thr Thr Val Ser Pro Thr Tyr Ser Gln Glu Val Ser	
955 960 965	
ga aac cct gta att gcg cct cac ctt cac aag ttc cat ggt ata gtg	3161
Gly Asn Pro Val Ile Ala Pro His Leu His Lys Phe His Gly Ile Val	
970 975 980 985	
at ggg att gac cca gat att tgg gat cct tta aac gat aag ttc att	3209
Asn Gly Ile Asp Pro Asp Ile Trp Asp Pro Leu Asn Asp Lys Phe Ile	
990 995 1000	
ccg att ccg tac acc tca gaa aac gtt gtt gaa ggc aaa aca gca	3254
Pro Ile Pro Tyr Thr Ser Glu Asn Val Val Glu Gly Lys Thr Ala	
1005 1010 1015	
gcc aag gaa gct ttg cag cga aaa ctt gga ctg aaa cag gct gac	3299
Ala Lys Glu Ala Leu Gln Arg Lys Leu Gly Leu Lys Gln Ala Asp	
1020 1025 1030	
ctt cct ttg gta gga att atc acc cgc tta act cac cag aaa gga	3344
Leu Pro Leu Val Gly Ile Ile Thr Arg Leu Thr His Gln Lys Gly	
1035 1040 1045	
atc cac ctc att aaa cat gct att tgg cgc acc ttg gaa cgg aac	3389
Ile His Leu Ile Lys His Ala Ile Trp Arg Thr Leu Glu Arg Asn	
1050 1055 1060	
gga cag gta gtc ttg ctt ggt tct gct cct gat cct agg gta caa	3434
Gly Gln Val Val Leu Leu Gly Ser Ala Pro Asp Pro Arg Val Gln	
1065 1070 1075	
aac gat ttt gtt aat ttg gca aat caa ttg cac tcc aaa tat aat	3479
Asn Asp Phe Val Asn Leu Ala Asn Gln Leu His Ser Lys Tyr Asn	
1080 1085 1090	
gac cgc gca cga ctc tgt cta aca tat gac gag cca ctt tct cac	3524
Asp Arg Ala Arg Leu Cys Leu Thr Tyr Asp Glu Pro Leu Ser His	
1095 1100 1105	

## BCS 03 5003.ST25.txt

ctg	ata	tat	gct	ggt	gct	gat	ttt	att	cta	gtt	cct	tca	ata	ttt	3569
Leu	Ile	Tyr	Ala	Gly	Ala	Asp	Phe	Ile	Leu	Val	Pro	Ser	Ile	Phe	
			1110					1115						1120	
gag	cca	tgt	gga	cta	aca	caa	ctt	acc	gct	atg	aga	tat	ggt	tca	3614
Glu	Pro	Cys	Gly	Leu	Thr	Gln	Leu	Thr	Ala	Met	Arg	Tyr	Gly	Ser	
			1125					1130						1135	
att	cca	gtc	gtg	cgt	aaa	act	gga	gga	ctt	tat	gat	act	gta	ttt	3659
Ile	Pro	Val	Val	Arg	Lys	Thr	Gly	Gly	Leu	Tyr	Asp	Thr	Val	Phe	
			1140					1145						1150	
gat	gtt	gac	cat	gac	aaa	gag	aga	gca	caa	cag	tgt	ggt	ctt	gaa	3704
Asp	Val	Asp	His	Asp	Lys	Glu	Arg	Ala	Gln	Gln	Cys	Gly	Leu	Glu	
			1155					1160						1165	
cca	aat	gga	ttc	agc	ttt	gat	gga	gca	gat	gct	ggc	gga	gtt	gat	3749
Pro	Asn	Gly	Phe	Ser	Phe	Asp	Gly	Ala	Asp	Ala	Gly	Gly	Val	Asp	
			1170					1175						1180	
tat	gct	ctg	aat	aga	gct	ctc	tct	gct	tgg	tac	gat	ggt	cgg	gat	3794
Tyr	Ala	Leu	Asn	Arg	Ala	Leu	Ser	Ala	Trp	Tyr	Asp	Gly	Arg	Asp	
			1185					1190						1195	
tgg	ttc	aac	tct	tta	tgc	aag	cag	gtc	atg	gaa	caa	gat	tgg	tct	3839
Trp	Phe	Asn	Ser	Leu	Cys	Lys	Gln	Val	Met	Glu	Gln	Asp	Trp	Ser	
			1200					1205						1210	
tgg	aac	cga	cct	gct	ctt	gat	tat	ttg	gag	ctt	tac	cat	gct	gct	3884
Trp	Asn	Arg	Pro	Ala	Leu	Asp	Tyr	Leu	Glu	Leu	Tyr	His	Ala	Ala	
			1215					1220						1225	
aga	aag	tta	gaa	tag	ttagt	ttgtg	agatg	ctagc	agaaaaattc	acgagat	ctg				3939
Arg	Lys	Leu	Glu												
			1230												
caatctgtac	aggttcagtg	tttgcgctctg	gacagctttt	ttatttccta	tatcaaagta										3999
taaatcaagt	ctacactgag	atcaatagca	gacagtcctc	agttcatttc	attttttgtg										4059
caacatatga	aagagcttag	cctctaataa	tgtagtcatt	gatgattatt	tgttttggga										4119
agaaatgaga	aatcaaagga	tgcaaaatac	tctgaaaaaa	aaaaaaaa											4167

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1230

&lt;212&gt; PRT

213&gt; Solanum tuberosum

400&gt; 2

```

et Asp Val Pro Phe Pro Leu His Arg Pro Leu Ser Cys Thr Ser Val
      5                      10                      15

er Asn Ala Ile Thr His Leu Lys Ile Lys Pro Phe Leu Gly Phe Val
      20                      25                      30

er His Gly Thr Thr Ser Leu Ser Val Gln Ser Ser Ser Trp Arg Lys
      35                      40                      45

sp Gly Met Val Thr Gly Val Ser Phe Pro Phe Cys Ala Asn Leu Ser
      50                      55                      60

ly Arg Arg Arg Arg Lys Val Ser Thr Thr Arg Ser Gln Gly Ser Ser
      5                      70                      75                      80

ro Lys Gly Phe Val Pro Arg Lys Pro Ser Gly Met Ser Thr Gln Arg
      85                      90                      95

ys Val Gln Lys Ser Asn Gly Asp Lys Glu Ser Gln Ser Thr Ser Thr
      100                      105                      110

er Lys Glu Ser Glu Ile Ser Asn Gln Lys Thr Val Glu Ala Arg Val
      115                      120                      125

lu Thr Ser Asp Asp Asp Thr Lys Val Val Val Arg Asp His Lys Phe
      130                      135                      140

eu Glu Asp Glu Asp Glu Ile Asn Gly Ser Thr Lys Ser Ile Ser Met
      145                      150                      155                      160

er Pro Val Arg Val Ser Ser Gln Phe Val Glu Ser Glu Glu Thr Gly
      165                      170                      175

gly Asp Asp Lys Asp Ala Val Lys Leu Asn Lys Ser Lys Arg Ser Glu
      180                      185                      190

```

Glu Ser Asp Phe Leu Ile Asp Ser Val Ile Arg Glu Gln Ser Gly Ser  
 195 200 205

Glu Gly Glu Thr Asn Ala Ser Ser Lys Gly Ser His Ala Val Gly Thr  
 210 215 220

Lys Leu Tyr Glu Ile Leu Gln Val Asp Val Glu Pro Gln Gln Leu Lys  
 225 230 235 240

Glu Asn Asn Ala Gly Asn Val Glu Tyr Lys Gly Pro Val Ala Ser Lys  
 245 250 255

Leu Leu Glu Ile Thr Lys Ala Ser Asp Val Glu His Thr Glu Ser Asn  
 260 265 270

Glu Ile Asp Asp Leu Asp Thr Asn Ser Phe Phe Lys Ser Asp Leu Ile  
 275 280 285

Glu Glu Asp Glu Pro Leu Ala Ala Gly Thr Val Glu Thr Gly Asp Ser  
 290 295 300

Ser Leu Asn Leu Arg Leu Glu Met Glu Ala Asn Leu Arg Arg Gln Ala  
 305 310 315 320

Ile Glu Arg Leu Ala Glu Glu Asn Leu Leu Gln Gly Ile Arg Leu Phe  
 325 330 335

Cys Phe Pro Glu Val Val Lys Pro Asp Glu Asp Val Glu Ile Phe Leu  
 340 345 350

Asn Arg Gly Leu Ser Thr Leu Lys Asn Glu Ser Asp Val Leu Ile Met  
 355 360 365

Gly Ala Phe Asn Glu Trp Arg Tyr Arg Ser Phe Thr Thr Arg Leu Thr  
 370 375 380

Glu Thr His Leu Asn Gly Asp Trp Trp Ser Cys Lys Ile His Val Pro  
 385 390 395 400

yys Glu Ala Tyr Arg Ala Asp Phe Val Phe Phe Asn Gly Gln Asp Val  
 405 410 415  
 yr Asp Asn Asn Asp Gly Asn Asp Phe Ser Ile Thr Val Lys Gly Gly  
 420 425 430  
 Met Gln Ile Ile Asp Phe Glu Asn Phe Leu Leu Glu Glu Lys Trp Arg  
 435 440 445  
 Glu Gln Glu Lys Leu Ala Lys Glu Gln Ala Glu Arg Glu Arg Leu Ala  
 450 455 460  
 Glu Glu Gln Arg Arg Ile Glu Ala Glu Lys Ala Glu Ile Glu Ala Asp  
 465 470 475 480  
 Arg Ala Gln Ala Lys Glu Glu Ala Ala Lys Lys Lys Lys Val Leu Arg  
 485 490 495  
 Glu Leu Met Val Lys Ala Thr Lys Thr Arg Asp Ile Thr Trp Tyr Ile  
 500 505 510  
 Glu Pro Ser Glu Phe Lys Cys Glu Asp Lys Val Arg Leu Tyr Tyr Asn  
 515 520 525  
 Lys Ser Ser Gly Pro Leu Ser His Ala Lys Asp Leu Trp Ile His Gly  
 530 535 540  
 Gly Tyr Asn Asn Trp Lys Asp Gly Leu Ser Ile Val Lys Lys Leu Val  
 545 550 555 560  
 Lys Ser Glu Arg Ile Asp Gly Asp Trp Trp Tyr Thr Glu Val Val Ile  
 565 570 575  
 Pro Asp Gln Ala Leu Phe Leu Asp Trp Val Phe Ala Asp Gly Pro Pro  
 580 585 590  
 Lys His Ala Ile Ala Tyr Asp Asn Asn His Arg Gln Asp Phe His Ala  
 595 600 605

## BCS 03 5003.ST25.txt

Ile Val Pro Asn His Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Trp Val Glu Glu Glu  
610 615 620

His Gln Ile Phe Lys Thr Leu Gln Glu Glu Arg Arg Leu Arg Glu Ala  
625 630 635 640

Ala Met Arg Ala Lys Val Glu Lys Thr Ala Leu Leu Lys Thr Glu Thr  
645 650 655

Lys Glu Arg Thr Met Lys Ser Phe Leu Leu Ser Gln Lys His Val Val  
660 665 670

Tyr Thr Glu Pro Leu Asp Ile Gln Ala Gly Ser Ser Val Thr Val Tyr  
675 680 685

Tyr Asn Pro Ala Asn Thr Val Leu Asn Gly Lys Pro Glu Ile Trp Phe  
690 695 700

Arg Cys Ser Phe Asn Arg Trp Thr His Arg Leu Gly Pro Leu Pro Pro  
705 710 715 720

Gln Lys Met Ser Pro Ala Glu Asn Gly Thr His Val Arg Ala Thr Val  
725 730 735

Lys Val Pro Leu Asp Ala Tyr Met Met Asp Phe Val Phe Ser Glu Arg  
740 745 750

Glu Asp Gly Gly Ile Phe Asp Asn Lys Ser Gly Met Asp Tyr His Ile  
755 760 765

Pro Val Phe Gly Gly Val Ala Lys Glu Pro Pro Met His Ile Val His  
770 775 780

Ile Ala Val Glu Met Ala Pro Ile Ala Lys Val Gly Gly Leu Gly Asp  
785 790 795 800

Val Val Thr Ser Leu Ser Arg Ala Val Gln Asp Leu Asn His Asn Val  
805 810 815

sp Ile Ile Leu Pro Lys Tyr Asp Cys Leu Lys Met Asn Asn Val Lys  
820 825 830

sp Phe Arg Phe His Lys Asn Tyr Phe Trp Gly Gly Thr Glu Ile Lys  
835 840 845

al Trp Phe Gly Lys Val Glu Gly Leu Ser Val Tyr Phe Leu Glu Pro  
850 855 860

ln Asn Gly Leu Phe Ser Lys Gly Cys Val Tyr Gly Cys Ser Asn Asp  
865 870 875 880

ly Glu Arg Phe Gly Phe Phe Cys His Ala Ala Leu Glu Phe Leu Leu  
885 890 895

ln Gly Gly Phe Ser Pro Asp Ile Ile His Cys His Asp Trp Ser Ser  
900 905 910

la Pro Val Ala Trp Leu Phe Lys Glu Gln Tyr Thr His Tyr Gly Leu  
915 920 925

er Lys Ser Arg Ile Val Phe Thr Ile His Asn Leu Glu Phe Gly Ala  
930 935 940

asp Leu Ile Gly Arg Ala Met Thr Asn Ala Asp Lys Ala Thr Thr Val  
945 950 955 960

er Pro Thr Tyr Ser Gln Glu Val Ser Gly Asn Pro Val Ile Ala Pro  
965 970 975

His Leu His Lys Phe His Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp Pro Asp Ile  
980 985 990

Trp Asp Pro Leu Asn Asp Lys Phe Ile Pro Ile Pro Tyr Thr Ser Glu  
995 1000 1005

Asn Val Val Glu Gly Lys Thr Ala Ala Lys Glu Ala Leu Gln Arg  
1010 1015 1020



Lys	Leu	Gly	Leu	Lys	Gln	Ala	Asp	Leu	Pro	Leu	Val	Gly	Ile	Ile
1025						1030					1035			
Thr	Arg	Leu	Thr	His	Gln	Lys	Gly	Ile	His	Leu	Ile	Lys	His	Ala
1040						1045					1050			
Ile	Trp	Arg	Thr	Leu	Glu	Arg	Asn	Gly	Gln	Val	Val	Leu	Leu	Gly
1055						1060					1065			
Ser	Ala	Pro	Asp	Pro	Arg	Val	Gln	Asn	Asp	Phe	Val	Asn	Leu	Ala
1070						1075					1080			
Asn	Gln	Leu	His	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asp	Arg	Ala	Arg	Leu	Cys	Leu
1085						1090					1095			
Thr	Tyr	Asp	Glu	Pro	Leu	Ser	His	Leu	Ile	Tyr	Ala	Gly	Ala	Asp
1100						1105					1110			
Phe	Ile	Leu	Val	Pro	Ser	Ile	Phe	Glu	Pro	Cys	Gly	Leu	Thr	Gln
1115						1120					1125			
Leu	Thr	Ala	Met	Arg	Tyr	Gly	Ser	Ile	Pro	Val	Val	Arg	Lys	Thr
1130						1135					1140			
Gly	Gly	Leu	Tyr	Asp	Thr	Val	Phe	Asp	Val	Asp	His	Asp	Lys	Glu
1145						1150					1155			
Arg	Ala	Gln	Gln	Cys	Gly	Leu	Glu	Pro	Asn	Gly	Phe	Ser	Phe	Asp
1160						1165					1170			
Gly	Ala	Asp	Ala	Gly	Gly	Val	Asp	Tyr	Ala	Leu	Asn	Arg	Ala	Leu
1175						1180					1185			
Ser	Ala	Trp	Tyr	Asp	Gly	Arg	Asp	Trp	Phe	Asn	Ser	Leu	Cys	Lys
1190						1195					1200			
Gln	Val	Met	Glu	Gln	Asp	Trp	Ser	Trp	Asn	Arg	Pro	Ala	Leu	Asp
1205						1210					1215			

yr Leu Glu Leu Tyr His Ala Ala Arg Lys Leu Glu  
 1220 1225 1230

210> 3

211> 61

212> PRT

213> Solanum tuberosum

400> 3

rg Ser Phe Thr Thr Arg Leu Thr Glu Thr His Leu Asn Gly Asp Trp  
 5 10 15

rp Ser Cys Lys Ile His Val Pro Lys Glu Ala Tyr Arg Ala Asp Phe  
 20 25 30

al Phe Phe Asn Gly Gln Asp Val Tyr Asp Asn Asn Asp Gly Asn Asp  
 35 40 45

he Ser Ile Thr Val Lys Gly Gly Met Gln Ile Ile Asp  
 50 55 60

210> 4

211> 1641

212> DNA

213> Solanum tuberosum

400> 4

atgaagcaca gttcagctat ttccgctggt ttgaccgatg acaattcgac aatggcaccc 60  
 cttagaggaag atgtcaacac tgaaaatatt ggcctcctaa atttgatcc aactttggaa 120  
 ctttatctag atcacttcag acacagaatg aagagatatg tggatcagaa aatgctcatt 180  
 gaaaaaatatg agggaccctt tgaggaattt gctcaagggt atttaaaatt tggattcaac 240

## BCS 03 5003.ST25.txt

```

agggaagatg gttgcatagt ctatcgtgaa tgggctcctg ctgctcagga agcagaagtt 300
attggcgatt tcaatggtag gaacggttct aaccacatga tggagaagga ccagtttggt 360
jtttgagta ttagaattcc tgatgttgac agtaagccag tcattccaca caactccaga 420
jttaagtttc gtttcaaaca tggtaatgga gtgtgggtag atcgtatccc tgcttgata 480
aagtatgcca ctgcagacgc cacaagttt gcagcaccat atgatggtgt ctactgggac 540
ccaccacctt cagaaaggta ccacttcaaa taccctcgcc ctcccaaacc ccgagcccca 600
cgaatctacg aagcacatgt cggcatgagc agctctgagc cacgtgtaaa ttcgtatcgt 660
gagtttgagc atgatgtttt acctcggatt aaggcaaata actataatac tgtccagttg 720
atggccataa tggaacattc ttactatgga tcatttgat atcatgttac aaactttttt 780
gctgtgagca atagatatgg aaaccggag gacctaaagt atctgataga taaagcacat 840
agcttgggtt tacaggttct ggtggatgta gttcacagtc atgcaagcaa taatgtcact 900
gatggcctca atggctttga tattggccaa ggttctcaag aatcctactt tcatgctgga 960
gagcgagggt accataagtt gtgggatagc aggctgttca actatgcaa ttgggagggt 1020
cttcgtttcc ttctttccaa cttgaggtgg tggctagaag agtataactt tgacggattt 1080
cgatttgatg gaataacttc tatgctgtat gttcatcatg gaatcaatat gggatttaca 1140
ggaaactata atgagtattt cagcgaggct acagatgttg atgctgtggt ctatttaatg 1200
ttggccaata atctgattca caagattttc ccagacgcaa ctgttattgc cgaagatgtt 1260
tctggtatgc cgggccttag ccggcctggt tctgagggag gaattggttt tgattaccgc 1320
ctggcaatgg caatcccaga taagtggata gattatttaa agaataagaa tgatgaagat 1380
tggtccatga aggaagtaac atcgagtttg acaaatagga gatatacaga gaagtgtata 1440
gcatatgcgg agagccatga tcagtctatt gtcggtgaca agaccattgc atttctccta 1500
atgaacaaag agatgtattc tggcatgtct tgcttgacag atgcttctcc tgttgttgat 1560
gcaggaattg cgcttgacaa gatgatccat ttttttcaca atggccttgg gaggagaggg 1620
gtacctcaat ttcatgggta a 1641

```

213> Solanum tuberosum

.300>

```
308> Swiss Prot / P30924
```

|309> 1993-07-26

400 > 5

Met Lys His Ser Ser Ala Ile Ser Ala Val Leu Thr Asp Asp Asn Ser  
5 10 15

Thr Met Ala Pro Leu Glu Glu Asp Val Asn Thr Glu Asn Ile Gly Leu  
20 25 30

Leu Asn Leu Asp Pro Thr Leu Glu Pro Tyr Leu Asp His Phe Arg His  
35 40 45

Arg Met Lys Arg Tyr Val Asp Gln Lys Met Leu Ile Glu Lys Tyr Glu  
50 55 60

Gly Pro Leu Glu Glu Phe Ala Gln Gly Tyr Leu Lys Phe Gly Phe Asn  
55 70 75 80

Arg Glu Asp Gly Cys Ile Val Tyr Arg Glu Trp Ala Pro Ala Ala Gln  
85 90 95

Glu Ala Glu Val Ile Gly Asp Phe Asn Gly Arg Asn Gly Ser Asn His  
100 105 110

Met Met Glu Lys Asp Gln Phe Gly Val Trp Ser Ile Arg Ile Pro Asp  
115 120 125

Val Asp Ser Lys Pro Val Ile Pro His Asn Ser Arg Val Lys Phe Arg  
130 135 140

## BCS 03 5003.ST25.txt

Phe Lys His Gly Asn Gly Val Trp Val Asp Arg Ile Pro Ala Trp Ile  
 145 150 155 160

Lys Tyr Ala Thr Ala Asp Ala Thr Lys Phe Ala Ala Pro Tyr Asp Gly  
 165 170 175

Val Tyr Trp Asp Pro Pro Pro Ser Glu Arg Tyr His Phe Lys Tyr Pro  
 180 185 190

Arg Pro Pro Lys Pro Arg Ala Pro Arg Ile Tyr Glu Ala His Val Gly  
 195 200 205

Met Ser Ser Ser Glu Pro Arg Val Asn Ser Tyr Arg Glu Phe Ala Asp  
 210 215 220

Asp Val Leu Pro Arg Ile Lys Ala Asn Asn Tyr Asn Thr Val Gln Leu  
 225 230 235 240

Met Ala Ile Met Glu His Ser Tyr Tyr Gly Ser Phe Gly Tyr His Val  
 245 250 255

Thr Asn Phe Phe Ala Val Ser Asn Arg Tyr Gly Asn Pro Glu Asp Leu  
 260 265 270

Lys Tyr Leu Ile Asp Lys Ala His Ser Leu Gly Leu Gln Val Leu Val  
 275 280 285

Asp Val Val His Ser His Ala Ser Asn Asn Val Thr Asp Gly Leu Asn  
 290 295 300

Gly Phe Asp Ile Gly Gln Gly Ser Gln Glu Ser Tyr Phe His Ala Gly  
 305 310 315 320

Glu Arg Gly Tyr His Lys Leu Trp Asp Ser Arg Leu Phe Asn Tyr Ala  
 325 330 335

Asn Trp Glu Val Leu Arg Phe Leu Leu Ser Asn Leu Arg Trp Trp Leu  
 340 345 350

Glu Glu Tyr Asn Phe Asp Gly Phe Arg Phe Asp Gly Ile Thr Ser Met  
 355 360 365

Leu Tyr Val His His Gly Ile Asn Met Gly Phe Thr Gly Asn Tyr Asn  
 370 375 380

Glu Tyr Phe Ser Glu Ala Thr Asp Val Asp Ala Val Val Tyr Leu Met  
 385 390 395 400

Leu Ala Asn Asn Leu Ile His Lys Ile Phe Pro Asp Ala Thr Val Ile  
 405 410 415

Ala Glu Asp Val Ser Gly Met Pro Gly Leu Ser Arg Pro Val Ser Glu  
 420 425 430

Gly Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Arg Leu Ala Met Ala Ile Pro Asp Lys  
 435 440 445

Trp Ile Asp Tyr Leu Lys Asn Lys Asn Asp Glu Asp Trp Ser Met Lys  
 450 455 460

Glu Val Thr Ser Ser Leu Thr Asn Arg Arg Tyr Thr Glu Lys Cys Ile  
 465 470 475 480

Ala Tyr Ala Glu Ser His Asp Gln Ser Ile Val Gly Asp Lys Thr Ile  
 485 490 495

Ala Phe Leu Leu Met Asn Lys Glu Met Tyr Ser Gly Met Ser Cys Leu  
 500 505 510

Thr Asp Ala Ser Pro Val Val Asp Ala Gly Ile Ala Leu Asp Lys Met  
 515 520 525

Ile His Phe Phe His Asn Gly Leu Gly Arg Arg Gly Val Pro Gln Phe  
 530 535 540

His Gly  
 545

<210> 6  
 <211> 2649  
 <212> DNA  
 <213> Solanum tuberosum

<300>  
 <308> EMBL / AJ011890  
 <309> 1999-04-07

<300>  
 <302> Improvments in or relating to plant starch composition  
 <308> EMBL / A58164  
 <309> 1998-03-05  
 <310> WO 96 34968  
 <311> 1996-05-03  
 <312> 1996-11-07

<400> 6  
 atggtgtata cactctctgg agttcgtttt cctactgttc catcagtgtg caaatctaataat 60  
 ggattcagca gtaatggtga tcggaggaat gctaattgtt ctgtattctt gaaaaagcac 120  
 tctctttcac ggaagatctt ggctgaaaag tcttcttaca attccgaatt ccgaccttct 180  
 acagttgcag catcggggaa agtccttgtg cctggaaccc agagtgatag ctccatcc 240  
 tcaacagacc aatttgagtt cactgagaca tctccagaaa attccccagc atcaactgat 300  
 gtagatagtt caacaatgga acacgctagc cagattaaaa ctgagaacga tgacgttgag 360  
 ccgtcaagtg atcttacagg aagtgttgaa gagctggatt ttgcttcatc actacaacta 420  
 caagaaggtg gtaaactgga ggagtctaaa acattaaata cttctgaaga gacaattatt 480

## BCS 03 5003.ST25.txt

gatgaatctg ataggatcag agagaggggc atccctccac ctggacttgg tcagaagatt	540
tatgaaatag accccctttt gacaaactat cgtcaacacc ttgattacag gtattcacag	600
tacaagaaac tgagggagggc aattgacaag tatgaggggtg gtttggaagc cttttctcgt	660
ggttatgaaa aaatggggtt cactcgtagt gctacaggta tcacttaccg tgagtgggct	720
cttggtgccc agtcagctgc cctcattgga gatttcaaca attgggacgc aaatgctgac	780
attatgactc ggaatgaatt tgggtgtctgg gagatttttc tgccaaataa tgtggatgg	840
tctcctgcaa ttcctcatgg gtccagagtg aagatacgta tggacactcc atcagggtgtt	900
aaggattcca ttcctgcttg gatcaactac tctttacagc ttcctgatga aattccatat	960
aatggaatac attatgatcc acccgaagag gagaggtata tcttccaaca cccacggcca	1020
aagaaaccaa agtcgctgag aatatatgaa tctcatattg gaatgagtag tccggagcct	1080
aaaattaact catacgtgaa ttttagagat gaagttcttc ctgcataaa aaagcttggg	1140
tacaatgocg tgcaaattat ggctattcaa gagcattctt attacgctag ttttggttat	1200
catgtcacia atttttttgc accaagcagc cgttttggaa cgcccgacga ccttaagtct	1260
ttgattgata aagctcatga gctaggaatt gttgttctca tggacattgt tcacagccat	1320
gcatcaaata atactttaga tggactgaac atgtttgact gcaccgatag ttgttacttt	1380
cactctggag ctcggtggta tcattggatg tgggattccc gcctctttaa ctatggaaac	1440
tgggaggtac ttaggtatct tctctcaaat gcgagatggg ggttggtatgc gttcaaattt	1500
gatggattta gatttgatgg tgtgacatca atgatgtata ttcaccacgg attatcgggtg	1560
ggattcactg ggaactacga ggaatacttt ggactcgcaa ctgatgtgga tgctgttgtg	1620
tatctgatgc tgggtcaacga tcttattcat gggcttttcc cagatgcaat taccattgg	1680
gaagatgtta gcggaatgcc gacattttgt attcccgtcc aagagggggg tgttggcttt	1740
gactatcggc tgcatatggc aattgctgat aaacggattg agttgctcaa gaaacgggat	1800
gaggattgga gagtgggtga tattgttcat aactgacaa atagaagatg gtcggaaaag	1860
tgtgtttcat acgctgaaag tcatgatcaa gctctagtcg gtgataaaac tatagcattc	1920
tggctgatgg acaaggatat gtatgatatt atggctctgg atagaccgtc aacatcatta	1980
atagatcgtg ggatagcatt gcacaagatg attaggcttg taactatggg attaggagga	2040



BCS 03 5003.ST25.txt

gaaggggtacc taaatttcat gggaaatgaa ttcgggccacc ctgagtggat tgatttccct 2100  
 agggctgaac aacacctctc tgatggctca gtaatccccg gaaaccaatt ccgttatgat 2160  
 aaatgcagac ggagatttga cctgggagat gcagaatatt taagataccg tgggttgcaa 2220  
 gaatttgacc ggcctatgca gtatcttgaa gataaatatg agtttatgac ttcagaacac 2280  
 cagttcatat cacgaaagga tgaaggagat aggatgattg tatttgaaaa aggaaaccta 2340  
 gtttttgtct ttaattttca ctggacaaaa agctattcag actatcgcat agcctgcctg 2400  
 aagcctggaa aatacccggt tgccttggac tcagatgatc cactttttgg tggcttcggg 2460  
 agaattgatc ataatgccga atatttcacc tttgaaggat ggtatgatga tcgtcctcgt 2520  
 tcaattatgg tgtatgcacc ttgtaaaaca gcagtggctc atgcactagt agacaaagaa 2580  
 gaagaagaag aagaagaaga agaagaagaa gtagcagcag tagaagaagt agtagtagaa 2640  
 gaagaatga 2649

<210> 7

<211> 882

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 7

Met Val Tyr Thr Leu Ser Gly Val Arg Phe Pro Thr Val Pro Ser Val  
 1 5 10 15

Tyr Lys Ser Asn Gly Phe Ser Ser Asn Gly Asp Arg Arg Asn Ala Asn  
 20 25 30

Val Ser Val Phe Leu Lys Lys His Ser Leu Ser Arg Lys Ile Leu Ala  
 35 40 45

Glu Lys Ser Ser Tyr Asn Ser Glu Phe Arg Pro Ser Thr Val Ala Ala  
 50 55 60

## BCS 03 5003.ST25.txt

er Gly Lys Val Leu Val Pro Gly Thr Gln Ser Asp Ser Ser Ser Ser  
 5 70 75 80

er Thr Asp Gln Phe Glu Phe Thr Glu Thr Ser Pro Glu Asn Ser Pro  
 85 90 95

la Ser Thr Asp Val Asp Ser Ser Thr Met Glu His Ala Ser Gln Ile  
 100 105 110

ys Thr Glu Asn Asp Asp Val Glu Pro Ser Ser Asp Leu Thr Gly Ser  
 115 120 125

al Glu Glu Leu Asp Phe Ala Ser Ser Leu Gln Leu Gln Glu Gly Gly  
 130 135 140

ys Leu Glu Glu Ser Lys Thr Leu Asn Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ile  
 145 150 155 160

asp Glu Ser Asp Arg Ile Arg Glu Arg Gly Ile Pro Pro Pro Gly Leu  
 165 170 175

Gly Gln Lys Ile Tyr Glu Ile Asp Pro Leu Leu Thr Asn Tyr Arg Gln  
 180 185 190

lis Leu Asp Tyr Arg Tyr Ser Gln Tyr Lys Lys Leu Arg Glu Ala Ile  
 195 200 205

asp Lys Tyr Glu Gly Gly Leu Glu Ala Phe Ser Arg Gly Tyr Glu Lys  
 210 215 220

Met Gly Phe Thr Arg Ser Ala Thr Gly Ile Thr Tyr Arg Glu Trp Ala  
 225 230 235 240

Leu Gly Ala Gln Ser Ala Ala Leu Ile Gly Asp Phe Asn Asn Trp Asp  
 245 250 255

Ala Asn Ala Asp Ile Met Thr Arg Asn Glu Phe Gly Val Trp Glu Ile  
 260 265 270

## BCS 03 5003.ST25.txt

Phe Leu Pro Asn Asn Val Asp Gly Ser Pro Ala Ile Pro His Gly Ser  
 275 280 285

Arg Val Lys Ile Arg Met Asp Thr Pro Ser Gly Val Lys Asp Ser Ile  
 290 295 300

Pro Ala Trp Ile Asn Tyr Ser Leu Gln Leu Pro Asp Glu Ile Pro Tyr  
 305 310 315 320

Asn Gly Ile His Tyr Asp Pro Pro Glu Glu Glu Arg Tyr Ile Phe Gln  
 325 330 335

His Pro Arg Pro Lys Lys Pro Lys Ser Leu Arg Ile Tyr Glu Ser His  
 340 345 350

Ile Gly Met Ser Ser Pro Glu Pro Lys Ile Asn Ser Tyr Val Asn Phe  
 355 360 365

Arg Asp Glu Val Leu Pro Arg Ile Lys Lys Leu Gly Tyr Asn Ala Leu  
 370 375 380

Gln Ile Met Ala Ile Gln Glu His Ser Tyr Tyr Ala Ser Phe Gly Tyr  
 385 390 395 400

His Val Thr Asn Phe Phe Ala Pro Ser Ser Arg Phe Gly Thr Pro Asp  
 405 410 415

Asp Leu Lys Ser Leu Ile Asp Lys Ala His Glu Leu Gly Ile Val Val  
 420 425 430

Leu Met Asp Ile Val His Ser His Ala Ser Asn Asn Thr Leu Asp Gly  
 435 440 445

Leu Asn Met Phe Asp Cys Thr Asp Ser Cys Tyr Phe His Ser Gly Ala  
 450 455 460

Arg Gly Tyr His Trp Met Trp Asp Ser Arg Leu Phe Asn Tyr Gly Asn  
 465 470 475 480

## BCS 03 5003.ST25.txt

Trp Glu Val Leu Arg Tyr Leu Leu Ser Asn Ala Arg Trp Trp Leu Asp  
 485 490 495

Ala Phe Lys Phe Asp Gly Phe Arg Phe Asp Gly Val Thr Ser Met Met  
 500 505 510

Tyr Ile His His Gly Leu Ser Val Gly Phe Thr Gly Asn Tyr Glu Glu  
 515 520 525

Tyr Phe Gly Leu Ala Thr Asp Val Asp Ala Val Val Tyr Leu Met Leu  
 530 535 540

Val Asn Asp Leu Ile His Gly Leu Phe Pro Asp Ala Ile Thr Ile Gly  
 545 550 555 560

Glu Asp Val Ser Gly Met Pro Thr Phe Cys Ile Pro Val Gln Glu Gly  
 565 570 575

Gly Val Gly Phe Asp Tyr Arg Leu His Met Ala Ile Ala Asp Lys Arg  
 580 585 590

Ile Glu Leu Leu Lys Lys Arg Asp Glu Asp Trp Arg Val Gly Asp Ile  
 595 600 605

Val His Thr Leu Thr Asn Arg Arg Trp Ser Glu Lys Cys Val Ser Tyr  
 610 615 620

Ala Glu Ser His Asp Gln Ala Leu Val Gly Asp Lys Thr Ile Ala Phe  
 625 630 635 640

Trp Leu Met Asp Lys Asp Met Tyr Asp Phe Met Ala Leu Asp Arg Pro  
 645 650 655

Ser Thr Ser Leu Ile Asp Arg Gly Ile Ala Leu His Lys Met Ile Arg  
 660 665 670

Leu Val Thr Met Gly Leu Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Asn Phe Met Gly  
 675 680 685

## BCS 03 5003.ST25.txt

Asn Glu Phe Gly His Pro Glu Trp Ile Asp Phe Pro Arg Ala Glu Gln  
 690 695 700

His Leu Ser Asp Gly Ser Val Ile Pro Gly Asn Gln Phe Arg Tyr Asp  
 705 710 715 720

Lys Cys Arg Arg Arg Phe Asp Leu Gly Asp Ala Glu Tyr Leu Arg Tyr  
 725 730 735

Arg Gly Leu Gln Glu Phe Asp Arg Pro Met Gln Tyr Leu Glu Asp Lys  
 740 745 750

Tyr Glu Phe Met Thr Ser Glu His Gln Phe Ile Ser Arg Lys Asp Glu  
 755 760 765

Gly Asp Arg Met Ile Val Phe Glu Lys Gly Asn Leu Val Phe Val Phe  
 770 775 780

Asn Phe His Trp Thr Lys Ser Tyr Ser Asp Tyr Arg Ile Ala Cys Leu  
 785 790 795 800

Lys Pro Gly Lys Tyr Pro Val Ala Leu Asp Ser Asp Asp Pro Leu Phe  
 805 810 815

Gly Gly Phe Gly Arg Ile Asp His Asn Ala Glu Tyr Phe Thr Phe Glu  
 820 825 830

Gly Trp Tyr Asp Asp Arg Pro Arg Ser Ile Met Val Tyr Ala Pro Cys  
 835 840 845

Lys Thr Ala Val Val Tyr Ala Leu Val Asp Lys Glu Glu Glu Glu Glu  
 850 855 860

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Val Ala Ala Val Glu Glu Val Val Val Glu  
 865 870 875 880

Glu Glu

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1255

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Solanum tuberosum

```

<400> 8
atatttgtatt cccgttcaag atgggggtgt tggctttgac tatcggctgc atatggcaat      60
tgctgataaa tggattgagt tgctcaagaa acgggatgag gattggagag tgggtgatat      120
tgttcataca ctgacaaata gaagatggtc ggaaaagtgt gtttcatacg ctgaaagtca      180
tgatcaagct ctagtcggtg ataaaactat agcattcttg ctgatggaca aggatatgta      240
tgattttatg gctttggata gaccgtcaac atcattaata gatcgtggga tagcattgca      300
caagatgatt aggcttgtaa ctatgggatt aggaggagaa gggtaacctaa atttcatggg      360
aaatgaattc ggccaccctg agtggattga tttccctagg gctgaacaac acctctctga      420
tggctcagta attcccggaa accaattcag ttatgataaa tgcagacgga gatttgacct      480
gggagatgca gaatatttaa gataccgtgg gttgcaagaa tttgaccggg ctatgcagta      540
tcttgaagat aaatatgagt ttatgacttc agaacaccag ttcatatcac gaaaggatga      600
aggagatagg atgattgtat ttgaaaaagg aaacctagtt tttgtcttta attttcaactg      660
gacaaaaagc tattcagact atcgcatagg ctgcctgaag cctggaaaat acaaggttgc      720
cttggactca gatgatccac tttttggtgg cttcgggaga attgatcata atgccgaatg      780
tttcaccttt gaaggatggt atgatgatcg tcctcgttca attatggtgt atgcacctag      840
tagaacagca gtggtctatg cactagtaga caaagaagaa gaagaagaag aagtagcagt      900
agtagaagaa gtagtagtag aagaagaatg aacgaacttg tgatcgcggt gaaagatttg      960
aacgctacat agagcttctt gacgtatctg gcaatattgc atcagtcctg gcggaatttc     1020
atgtgacaaa aggtttgcaa ttctttccac tattagtagt gcaacgatat acgcagagat     1080
gaagtgctga acaaacatat gtaaaatcga tgaatttatg tcgaatgctg ggacgggctt     1140
cagcaggttt tgcttagtga gttctgtaaa ttgtcatctc tttatatgta cagccaacta     1200
gaaatcaatt atgtgagacc taaaatacaa taaccataaa atggaaatag tgctg         1255

```

BCS 03 5003.ST25.txt

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**